

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CAMPOS ATHERINO



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, ANTIPROLIFERATIVO E
ANTI-METASTÁTICO *IN VITRO* DE *Lafoensia pacari* A. St-Hil. EM CÉLULAS
DE CÂNCER COLORRETAL

CURITIBA

2020

JULIANA CAMPOS ATHERINO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, ANTIPROLIFERATIVO E ANTI-METASTÁTICO *IN VITRO* DE *Lafoensia pacari* A. St-Hil. EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Profº Dr. Wesley Maurício de Souza

Co-orientadores:

Profª Dra. Karina Bettega Felipe

Profª Dra. Amanda Rabello Crisma

CURITIBA

2020

Atherino, Juliana Campos

Avaliação do potencial citotóxico, antiproliferativo e anti-metastático *in vitro* de *Lafoensia pacari* em células de câncer colorretal [recurso eletrônico] / Juliana Campos Atherino – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Bettega Felipe

Coorientadora: Profa. Dra. Amanda Rabello Crisma

1. *Lafoensia pacari*. 2. Citotoxicidade. 3. Óxido nítrico. 4. Metástase. 5. Câncer colorretal. I. Souza, Wesley Maurício de. II. Felipe, Karina Bettega. III. Crisma, Amanda Rabello. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA CAMPOS ATHERINO** intitulada: **Avaliação do potencial citotóxico, antiproliferativo e anti-metastático *in vitro* de *Lafoensia pacari* A. St-Hil. em células de câncer colorretal**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2020.

KARINA BETTEGA FELIPE

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

KÁTIA SABRINA PALUDO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

EDUARDO BENEDETTI PARISOTTO

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL)

*À minha irmã Mariana, por me incentivar
e me mostrar o caminho a ser seguido,
caminhando sempre ao meu lado, sendo
apoio quando necessário.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por guiar o meu caminho, sendo força e luz sempre;

Aos meus pais Salete e Achyles, pelo apoio e amor incondicional;

À Prof. Karina pela orientação e apoio, viabilizando a realização deste trabalho;

Ao Prof. Wesley, por me receber de portas abertas, sempre muito atencioso e gentil;

À Prof. Amanda por compartilhar seus conhecimentos e o seu tempo;

Aos meus colegas de mestrado Blanca, Fernanda e André, pelo acolhimento, pela força, pelas risadas e momentos de descontração;

Ao Maurício e Gracinha da Central Analítica, pela paciência e pela confiança;

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A *Lafoensia pacari* tem sido popularmente utilizada para o tratamento do câncer e de doenças inflamatórias. Estudos demonstram que o extrato metanólico da planta é capaz de induzir a apoptose em células de câncer colorretal (HRT-18), entretanto, os mecanismos envolvidos na mediação deste efeito, bem como a capacidade desta espécie vegetal em interferir na angiogênese e na metástase, ainda não foram elucidados. Desta forma, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito citotóxico, antiproliferativo e anti-metastático *in vitro* de extratos de *L. pacari* em células HRT-18, bem como verificar se tais efeitos estão associados à modulação da via do óxido nítrico (ON). O efeito citotóxico/antiproliferativo de 19 extratos da casca do caule de *L. pacari* produzidos a partir dos solventes água, metanol, etanol, acetona e combinações entre os mesmos, foi avaliado pela redução da resazurina em células HRT-18 e McCoy. De maneira geral, todos os extratos testados exerceram citotoxicidade significativa em células HRT-18, destacando-se o extrato E-14, que apresentou maior seletividade, sendo seu efeito confirmado pelo ensaio clonogênico e fragmentação do DNA. O ensaio de *wound healing* mostrou que E-14 foi capaz de inibir a migração de células HRT-18 na concentração de 16 µg/mL em torno de 61%. Além disso, observou-se que E-14 reduziu em torno de 73% o potencial invasivo de células HRT-18 na concentração de 16 µg/mL após 48 h de tratamento. Por meio da reação de Griess foi possível verificar que o tratamento com E-14 reduziu significativamente a produção de ON na linhagem tumoral. Adicionalmente, o ensaio de zimografia demonstrou que o E-14 foi capaz de bloquear a atividade das formas latentes de MMP-9 e reduziu significativamente (86%) a atividade de MMP-9 ativa. Os resultados sugerem que E-14 exerce efeito citotóxico e anti-metastático significativo através da via de inibição do ON.

Palavras chave: *Lafoensia pacari*, citotoxicidade, óxido nítrico, anti-metastático.

ABSTRACT

Lafoensia pacari has been popularly used for the treatment of various types of cancer and inflammatory diseases. Studies demonstrate that the methanolic extract of plant is capable of inducing in colorectal cancer cells (HRT-18), however, the mechanisms involved in mediating this effect, as well as the ability of this plant species to interfere in angiogenesis and metastasis, have not yet been elucidated. Thus, this work aims to evaluate the cytotoxic, antiproliferative and anti-metastatic effect *in vitro* of *L.pacari* extracts in HRT-18 cells, as well as to verify if these effects are associated with the modulation of the nitric oxide (NO) pathway. The cytotoxic/antiproliferative effect of 19 *L. pacari* stem bark extracts produced from the solvents water, methanol, ethanol, acetone and combinations between them was evaluated by the reduction of resazurin in HRT-18 and McCoy cells. In general, all the tested extracts exerted significant cytotoxicity in HRT-18 cells, especially the E-14 extract, which showed greater selectivity and its effect was confirmed by the clonogenic and DNA fragmentation assay. The wound healing assay showed that E-14 was able to inhibit the migration of HRT-18 cells at a concentration of 16 ug/mL around 61%. In addition, the transwell cell invasion assay demonstrated that E-14 was able to reduce the invasive ability of HRT-18 cells by 73% at a concentration of 16 ug/mL after 48 h of treatment. Through the Griess reaction it was possible to verify that the treatment with E-14 significantly reduced the production of NO in the tumor lineage. The zymography assay showed that E-14 was able to block the activity of latent forms of MMP-9 and significantly reduced (86%) the activity of active MMP-9. The results suggest that E-14 exerts a significant cytotoxic and anti-metastatic effect through the NO inhibition pathway.

Key words: *Lafoensia pacari*, cytotoxicity, nitric oxide, anti-metastatic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ETAPAS DA METÁSTASE.....	23
FIGURA 2 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS VIAS MOLECULARES QUE LEVAM À APOPTOSE.....	27
FIGURA 3 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CARACTERÍSTICAS CELULARES DA NECROSE (ESQUERDA) E APOPTOSE (DIREITA).....	28
FIGURA 4 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA INTRÍNSECA QUE CONECTA A INFLAMAÇÃO E A CARCINOGENESE.....	32
FIGURA 5 –	ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>Lafoensia pacari</i> A. St. Hil.....	38
FIGURA 6 –	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOTADA PARA A INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO/ ANTIPROLIFERATIVO E ANTI-METASTÁTICO <i>IN VITRO</i> DOS 19 EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS CASCAS DE <i>L.pacari</i>	40
FIGURA 7 –	EFEITOS DO FLUXO DE ÓXIDO NÍTRICO NA SINALIZAÇÃO TUMORAL.....	50
FIGURA 8 –	EFEITO ANTICLONOGÊNICO DO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	54
FIGURA 9 –	FRAGMENTAÇÃO DO DNA INDUZIDA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	56
FIGURA 10 –	ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA DO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	57
FIGURA 11 –	INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR PROMOVIDA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	58
FIGURA 12 –	INIBIÇÃO DA INVASÃO CELULAR MEDIADA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	59

FIGURA 13 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PRÓ-MMP-9 E MMP-9 MEDIADA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	60
FIGURA 14 – REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIADA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	61
FIGURA 15 – HIPÓTESE DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA, ANTIPROLIFERATIVA E ANTI-METASTÁTICA DO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LISTA DE AGENTES ANTIANGIOGÊNICOS APROVADOS PELA FDA.....	24
TABELA 2 – PRINCIPAIS TIPOS DE MORTE CELULAR PROGRAMADA E SUAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.....	29
TABELA 3 – CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS ASSOCIADAS A NEOPLASIAS.....	31
TABELA 4 – PRINCIPAIS CITOCINAS E QUIMIOCINAS QUE VINCULAM CÂNCER À INFLAMAÇÃO E SUAS FUNÇÕES.....	33
TABELA 5 – AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS TESTADOS EM ENSAIOS CLÍNICOS EM PACIENTES COM CÂNCER.....	36
TABELA 6 – PANORAMAS DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE <i>Lafoensia pacari</i> E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ASSOCIADAS A ESTES EFEITOS.....	39
TABELA 7 – RELAÇÃO DE EXTRATOS OBTIDOS COM DIFERENTES LÍQUIDOS EXTRATORES PELO MÉTODO SIMPLEX CENTROID DESIGN.....	42
TABELA 8 - VALORES DE Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) OBTIDOS APÓS O TRATAMENTO DE CÉLULAS HRT-18 E MCCOY COM OS 19 EXTRATOS DE <i>L. pacari</i> (1 - 50 mg/mL) OU 5-FLUOROURACIL (0,125 – 8 nM) PELO PERÍODO DE 72 HORAS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	- Fluoróforo 7-Aminoactinomicina D
5-FU	- 5-fluorouracil
Apaf-1	- Fator de ativação 1 da protease apoptótica
ATP	- Adenosina trifosfato
BCRJ	- Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	- Albumina do soro bovino
CARD	- Domínio de recrutamento da caspase
Cav-1	- Caveolin-1
CCR	- Carcinoma colorretal
CI ₅₀	- Concentração inibitória 50%
COX-2	- Ciclooxygenase 2
DED	- Domínio efetor da morte
DISC	- Complexo indutor de morte
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs	- Proteína quinase dependente de DNA
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	- Epitélio-mesenquimal
ERNS	- Espécies reativas de nitrogênio
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
FDA	- Food and Drug Administration
FGF	- Fator de crescimento de fibroblastos
Fas-L	- Ligante Fas
HIF1 α	- Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa
I κ B	- Proteína inibitória de NF- κ B
IFN-g	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
IS	- Índice de seletividade
LPS	- Lipopolissacarídeo
MB	- Membrana basal
MEC	- Matriz extracelular
MDR	- Resistência a múltiplas drogas

MMPs	- Metaloproteinases
MTT	- 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NFkB	- Fator nuclear <i>kappa</i> B
ON	- Óxido nítrico
OS	- Fosfatidilserina
PARP	- Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	- Tampão fosfato-salino
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
STAT 3	- Transdutor de sinal e ativadores de transcrição 3
TAE	- Tumor ascítico de Ehrlich
TEM	- Transição epitelial-mesenquimal
TEM-FTs	- Fatores de transcrição indutores de TEM
TIC	- Cromatograma de Íons Totais
TNF α	- Factor de necrose tumoral <i>alfa</i>
TGF- β	- Fator de transformação do crescimento beta
TNFR1	- Receptores transmembranares TNF tipo 1
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 CÂNCER - Aspectos gerais.....	18
3.1.1 Câncer Colorretal	20
3.2 METÁSTASE E ANGIOGÊNESE.....	21
3.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	25
3.3.1 Apoptose	25
3.3.2 Necrose	27
3.3.3 Outros tipos de morte celular	28
3.4 CÂNCER E INFLAMAÇÃO.....	30
3.5 <i>Lafoensia pacari</i> A. St. – Hil., LYTHRACEAE	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 REAGENTES	40
4.2 MATERIAL BOTÂNICO.....	41
4.3 CULTIVO DE CÉLULAS.....	42
4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	43
4.4.1 Avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo	43
4.4.2 Avaliação do potencial anti-metastático <i>in vitro</i>	46
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	51
5.1.1 Avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo.....	51

5.2.2 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico).....	53
5.2.3 Avaliação da fragmentação do DNA	55
5.2.4 Determinação do tipo de morte celular induzida	56
5.2.5 Avaliação da migração celular.....	58
5.2.6 Avaliação do potencial invasivo.....	59
5.2.7 Avaliação da atividade de metaloproteinases	60
5.2.8 Avaliação da produção de óxido nítrico	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	76
8 PERSPECTIVAS.....	77
9 REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Embora já existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhum destes foram eficazes e seletivos a ponto de regredir completamente as diferentes manifestações desta doença, nem de minimizar a indução de efeitos tóxicos e adversos, bem como de evitar a multiresistência (JENDIROBA et al., 2002).

Sabe-se que 20% dos cânceres humanos estão vinculados a inflamação crônica, merecendo destaque o câncer colorretal (GALDIERO; MARONE; MANTOVANI, 2018). Nas células tumorais, a inflamação crônica acarreta na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), transdutor de sinal e ativadores de transcrição 3 (STAT3) e fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF1 α), o que culmina na superexpressão de citocinas, quimiocinas e enzimas inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) e ciclooxigenase 2 (COX-2), bem como em níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Esses fatores, podem atuar de forma autócrina e parácrina, recrutando e ativando outras células do sistema imune, células tumorais e do estroma, as quais interagem e formam o microambiente tumoral, estabelecendo um *cross talking* entre as mesmas e contribuindo para a promoção de angiogênese, invasão e metástase, bem como para a sobrevivência e proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento e progressão tumoral e sustentando a inflamação associada ao câncer (MANTOVANI et al., 2008; WU et al., 2014; TODORIC; ANTONUCCI; KARIN, 2016).

Um importante mediador inflamatório envolvido na tumorigênese, progressão e invasão tumoral, trata-se do óxido nítrico. Tem sido observado que o óxido nítrico regula positivamente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como fatores de transcrição e enzimas envolvidas em mecanismos de reparo do DNA como a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), contribuindo para a promoção de vasodilatação, angiogênese e sobrevivência tumoral (PAPAPETROPOULOS et al., 1997; LALA; CHAKRABORTY, 2001; XU et al., 2002; SALIMIAN; ACHREJA; NAGRATH, 2017). Outras vias de transdução de sinal e fatores de transcrição

modulados pelo ON incluem a via da PI3K/AKT, das MAPK (ERK) e o HIF1 α , favorecendo a proliferação e sobrevivência, bem como contribuindo para as alterações metabólicas características das células tumorais (SOMASUNDARAM et al., 2019).

Devido ao seu uso popular para o tratamento do câncer, uma espécie vegetal que tem sido amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa acerca de seu potencial antitumoral e que se trata do objeto de estudo do presente projeto, é a *Lafoensia pacari*. Foi verificado que o extrato metanólico obtido das cascas da planta apresenta importante atividade citotóxica sobre diversas linhagens tumorais leucêmicas e de câncer colorretal (MARCONDES et al., 2014; REICHERT et al., 2018). Entretanto, o mecanismo de ação antitumoral desses extratos ainda não foi bem elucidado. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa, revelaram que o extrato metanólico de *L. pacari* apresenta diversos compostos com potencial anti-inflamatório em sua composição, incluindo elagitaninos, ácido elágico e catequinas (REICHERT et al., 2018), evidenciando uma possível correlação entre efeito antitumoral e anti-inflamatório, a qual deve ser melhor explorada.

Levando-se em consideração a experiência do grupo tanto na produção de extratos e identificação química de constituintes de produtos naturais, como na elucidação de possíveis atividades biológicas dos mesmos, destacando-se a pesquisa em bases moleculares do câncer e inflamação, pretendeu-se com o desenvolvimento deste trabalho, verificar se a modulação da via do ON estaria relacionada a ação citotóxica, antiproliferativa e anti-metastática de extratos de *L. pacari* em células de carcinoma colorretal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico, antiproliferativo e anti-metastático *in vitro* de extratos de *Lafoensia pacari* em células de carcinoma colorretal, bem como correlacionar tais atividades à modulação da via do ON.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade, o efeito antiproliferativo e a seletividade dos diferentes extratos de *L. pacari* em linhagem celular de carcinoma colorretal HRT-18 e célula normal McCoy, identificando o extrato mais efetivo e seletivo;
- Determinar o tipo de morte induzida pelo extrato mais efetivo sobre células HRT-18;
- Verificar o potencial efeito anti-migratório e anti-invasivo do extrato mais efetivo na linhagem supracitada, verificando se o mesmo é capaz de inibir a atividade de metaloproteinases;
- Correlacionar, de maneira preliminar, o efeito citotóxico, antiproliferativo e anti-metastático *in vitro*, à modulação da via do ON.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER - Aspectos gerais

O câncer é uma família de mais de cem doenças caracterizada pelo crescimento desordenado de células que podem afetar qualquer órgão do corpo e invadir outros tecidos em um processo denominado metástase (FLOOR et al., 2012; INCA, 2019 a).

Tal patologia é considerada um grande problema de saúde pública a nível mundial devido ao seu alto índice de mortalidade e ao aumento do número de novos casos registrados (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; INCA, 2019 b). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o triênio 2020-2022 a ocorrência de 625 mil novos casos da doença (INCA, 2019 b).

O processo de formação do câncer é iniciado através de mutações genéticas em uma célula normal, onde as mesmas podem ser causadas por fatores externos (exposição a substâncias químicas, irradiação, contato com micro-organismos e hábitos de vida) ou internos ao organismo (hormônios, mutações genéticas herdadas e condições imunológicas). Esses fatores de risco podem atuar simultaneamente ou em sequência para iniciar e/ou promover o crescimento tumoral (INCA, 2019 a; ACS, 2019).

As mutações genéticas relacionadas à malignização celular desempenham duas funções essenciais: a) aumentam a atividade de oncogenes; b) inativam genes supressores de tumor. Os oncogenes em sua maioria são considerados versões superexpressas de genes celulares normais (proto-oncogenes) envolvidos na sobrevivência celular (VINAY et al., 2013). Já os genes supressores de tumor são responsáveis por codificar proteínas importantes na regulação do ciclo celular e apoptose, inibindo a formação de tumores (MACLEOD, 2000). Tais mutações acarretam na multiplicação celular descontrolada, na evasão de vias de morte celular programada e no crescimento tumoral (BERTRAM, 2001; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, as mutações mais frequentes estão associadas ao aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) e a perda da função do gene P53, responsável por identificar e reparar anormalidades e danos no DNA, bem como de induzir a apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outras características que células tumorais adquirem ao sofrerem mutações genéticas em oncogenes e genes supressores tumorais incluem a capacidade de modificarem seu metabolismo energético, de evadirem do sistema imune, ou de fazer com que este corrobore para sua proliferação e propagação (HANNAHAN; WEINBERG, 2011).

Tradicionalmente, os métodos mais utilizados para o tratamento do câncer incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Entretanto, acompanhando os avanços na medicina, outras modalidades vêm sendo utilizadas, entre elas estão a terapia hormonal, terapia antiangiogênica e imunoterapia (INCA, 2017; ABBAS; REHMAN, 2018).

A cirurgia, também conhecida como ressecção, consiste na remoção total ou parcial do tumor. Geralmente é acompanhada de quimioterapia ou radioterapia a fim de aumentar a eficácia do tratamento. É considerado um dos métodos mais promissores, uma vez que promove menos danos aos tecidos em comparação aos outros métodos tradicionais (ABBAS; REHMAN, 2018; INCA, 2018).

A radioterapia corresponde ao método de tratamento local do câncer que utiliza um agente físico (radiação ionizante) para destruir as células cancerígenas ou alterá-las geneticamente para que elas ativem mecanismos de morte celular programada como a apoptose. Além disso, é capaz de reduzir o tamanho dos tumores, contribuindo para a diminuição dos sintomas inerentes a doença e para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (BASKAR et al., 2012; ABBAS; REHMAN, 2018; INCA, 2019 a). Assim como a cirurgia, usualmente a radioterapia é acompanhada de outras modalidades de tratamento para aumentar sua eficácia, porém, ela se mostra capaz de curar alguns tipos de cânceres em estágio inicial, como o câncer de pele, pulmão e de cabeça e pescoço (BASKAR et al., 2012).

A quimioterapia constitui uma das formas de tratamento mais utilizadas e envolve o uso de fármacos que objetivam a destruição das células neoplásicas e preservação do tecido adjacente. Porém, a maioria dos quimioterápicos atua de forma não específica, lesando também as células normais, em especial as de rápida proliferação, e gerando efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e imunossupressão (MILLER et al., 1981; DE ALMEIDA, et al., 2005).

Adicionalmente, outra limitação associada a quimioterapia refere-se ao desenvolvimento de resistência a fármacos, que pode se manifestar durante o tratamento (resistência adquirida) ou ser decorrente de mediadores de resistência intrínsecos do paciente (resistência intrínseca), que tornam a terapia ineficaz (HOLOHAN et al., 2013). Desta forma, ressalta-se a importância do desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias voltadas para o tratamento do câncer (MUKHERJEE, et al., 2001).

3.1.1 Câncer Colorretal

O carcinoma colorretal (CCR) é decorrente do crescimento anormal e desordenado de células do intestino grosso, mais precisamente do cólon e reto (ACS, 2019). Este câncer possui grande relevância epidemiológica pois está classificado como a terceira neoplasia mais diagnosticada mundialmente e encontra-se entre as cinco maiores causas de mortalidade por câncer na população brasileira (INCA, 2017; INCA, 2019 a; INCA, 2019 b).

Mais da metade dos cânceres colorretais são atribuíveis a hábitos alimentares e estilo de vida, podendo citar como fatores de pré-disposição uma alimentação rica em gorduras saturadas, carne vermelha e processada, baixa ingestão de legumes, frutas e fibras, obesidade, inatividade física, dentre outros (INCA, 2019 b, ACS, 2019). Ademais, doenças inflamatórias como colite ulcerativa e doença de Crohn, que causam a exposição prolongada do intestino a inflamação, demonstram dobrar o risco de desenvolvimento de CCR (ACS, 2017).

Em relação as mutações envolvidas no CCR esporádico, os principais genes associados ao desenvolvimento dessa doença são os oncogenes da família RAS (K-RAS, H-RAS e N-RAS) e os genes supressores de tumor APC e TP53 (PARREIRAS et al., 2013; STINTZING, 2014).

Adicionalmente, o CCR pode apresentar caráter hereditário, os quais representam cerca de 5% de todos os casos de carcinoma colorretal (ACS, 2017). As síndromes hereditárias ocorrem frequentemente em indivíduos que herdam uma alteração em algum gene supressor de tumor. Tal alteração ocorre espontaneamente em uma célula durante o seu crescimento ou desenvolvimento e pode resultar em proliferação de células contendo material genético mutado

(PARREIRAS et al., 2013; ACS, 2017). Os principais genes associados ao CCR hereditário incluem: o APC, associado a polipose familiar hereditária; MLH1, MSH2 e MSH6, que se encontram mutados na síndrome de Lynch e SMAD4, cujas mutações são observadas em casos de polipose familiar juvenil (VALADÃO; CASTRO, 2007; PARREIRAS et al., 2013).

A forma mais comum de tratar o CCR é realizar a remoção cirúrgica do tumor, a qual geralmente é acompanhada por quimioterapia antes e após o procedimento. Dentre os medicamentos quimioterápicos mais utilizados estão o 5-fluorouracil (5-FU), a oxaliplatina, a capecitabina e o irinotecano. A escolha da melhor estratégia de tratamento varia de acordo com a localização e extensão do tumor, a tolerância do paciente e a presença de metástase (ACS, 2017; KUIPERS, et al., 2015).

Atualmente, tem-se intensificado a busca por novos medicamentos antineoplásicos para o CCR, com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais decorrentes dos tratamentos convencionais e aumentar a eficácia do tratamento no cenário metastático. Neste sentido, tem se destacado o uso de fármacos que atuam em moléculas específicas envolvidas no desenvolvimento e progressão do tumor, como inibidores do receptor VEGF e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (STINTZING, 2014; ACS, 2017). Dentre os principais inibidores de EGFR utilizado clinicamente, destaca-se o cetuximabe e panitumumabe. Como exemplo de inibidores de VEGF prescritos na clínica, pode-se citar o Bevacizumabe, Regorafenibe e Brivanibe (MUSUMECI et al., 2012).

3.2 METÁSTASE E ANGIOGÊNESE

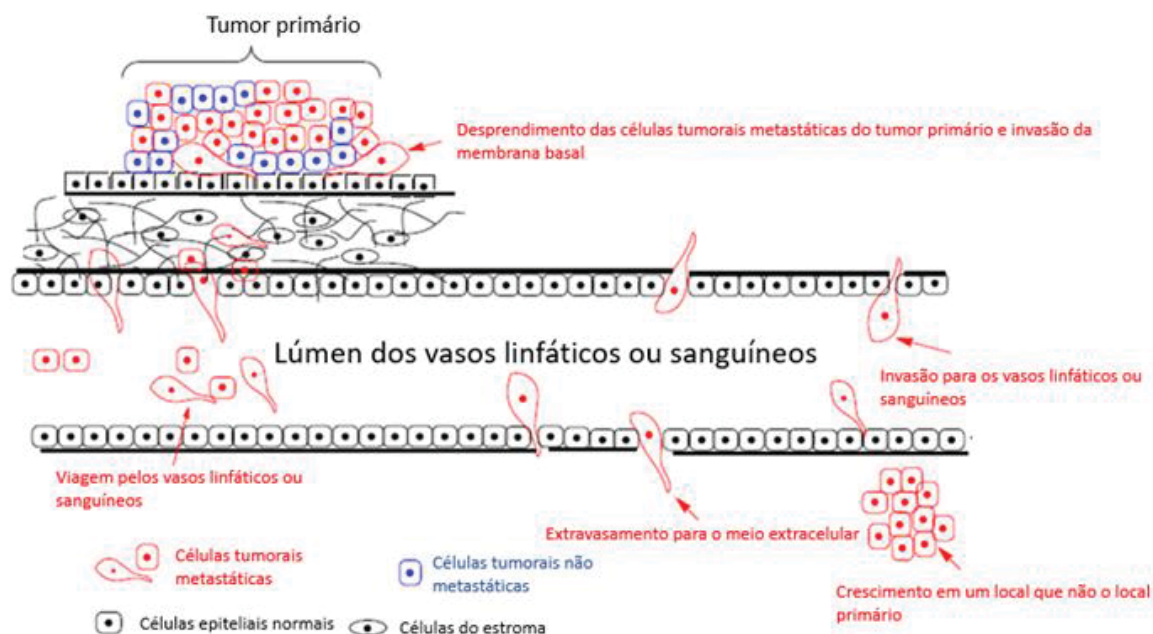
Células tumorais malignas são capazes de se disseminar a partir do tumor primário e de se instalar em um tecido anatomicamente distante por meio de vasos sanguíneos e linfáticos, dando origem a um tumor secundário. O processo de disseminação e instalação tumoral em um sítio anatômico distante da origem, denomina-se metástase. Tal processo é responsável por cerca de 90% das mortes em pacientes oncológicos (HUNTER; CRAWFORD; ALSARRAJ, 2008; GEIGER; PEEPER, 2009; CHAFFER; WEINBERG, 2011; GUAN, 2015).

Para que o processo metastático ocorra de forma bem-sucedida, as células cancerígenas devem completar com êxito algumas etapas essenciais (Figura 1). O primeiro passo trata-se da ocorrência da transição epitelial-mesenquimal (TEM) no tumor primário. Conduzida por fatores de transcrição indutores de TEM (TEM-FTs), a transição epitelial-mesenquimal permite que células do fenótipo epitelial gerem derivados mesenquimais, conferindo às células um conjunto de características que as capacitam de se disseminarem. Tais características incluem a interrupção do contato estreito entre células, a aquisição de morfologia fibroblastóide, o aumento da capacidade invasiva, bem como a resistência a *anoikis* (CHAFFER; WEINBERG, 2011; GUAN, 2015; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006). Em seguida, enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (MMPs) entram em ação e promovem a degradação das membranas basais (MB) e o remodelamento da matriz extracelular (MEC), facilitando a invasão das células neoplásicas para o tecido adjacente ao tumor (LEBER; EFFERTH, 2009; GUAN, 2015; GEIGER, PEEPER, 2009).

Para que haja a produção de metástases distantes, a invasão de tecidos adjacentes por si só não é suficiente, desta forma, células tumorais atravessam o endotélio vascular, atingindo vasos sanguíneos e/ou linfáticos, sendo transportadas até o sítio secundário (GEIGER, PEEPER, 2009). Nesta etapa, como as células tumorais precisam sobreviver a altas concentrações de oxigênio e a ação de linfócitos citotóxicos até atingirem o órgão alvo, ocorre a seleção das células mais agressivas e resistentes (LEBER; EFFERTH, 2009; GUAN, 2015).

Ao atingirem o órgão alvo, as células tumorais deixam a corrente sanguínea e/ou linfática e se instalam no local criando um ambiente adequado para a sedimentação e crescimento do tumor secundário (DUFFY, 1996; LEBER; EFFERTH, 2009).

FIGURA 1 – ETAPAS DA METÁSTASE.



FONTE: Adaptado de Guan (2015).

NOTA: As células metastáticas se desprendem do local primário do tumor e invadem, através da membrana basal, os vasos sanguíneos ou linfáticos, viajam até o local secundário, deixam o sangue ou vasos linfáticos, aderem e crescem no local.

Um evento que merece destaque no processo metastático é a angiogênese, processo caracterizado pela formação de novos vasos sanguíneos e pelo suprimento adequado de nutrientes e de oxigênio para as células tumorais (LEBER; EFFERTH, 2009; GEIGER; PEEPER, 2009).

Mediante a importância da angiogênese no desenvolvimento e progressão tumoral, a inibição desse processo caracteriza-se como uma estratégia atraente para o tratamento de tumores, principalmente com o intuito de intensificar os métodos convencionais utilizados (ABBAS; REHMAN, 2018; ECCLES; WELCH, 2007; AL-ABD et al., 2017). Os principais fármacos antiangiogênicos utilizados na prática clínica estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – LISTA DE AGENTES ANTIANGIOGÊNICOS APROVADOS PELA FDA.

Agente antiangiogênico	Função	Indicações clínicas
Bevacizumabe	Anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado	Câncer de pulmão, rim, cólon e reto, ovário, mama, cervical e glioblastoma
ZIV-Aflibercept	Proteína de fusão direcionada contra VEGF-A, VEGF-B e PlGF	Câncer colorretal metastático (em combinação com 5-FU, leucovorin e Irinotecano)
Sorafenibe	Inibidor de tirosina quinase	Câncer de rim, fígado e tireóide
Sunitinibe	Inibidor de tirosina quinase	Câncer de rim, fígado e tireóide
Axitinibe	Inibidor de receptor de tirosina quinase	Câncer de rim avançado
Nintedanib	Inibidor de receptor de tirosina quinase	Fibrose pulmonar idiopática
Regorafenib	Inibidor de receptor de tirosina quinase	Câncer colorretal metastático, gastrointestinal, hepático e tumor estromal
Pazobanib	Inibidor de receptor de tirosina quinase	Câncer de rim avançado
Cabozantinib	Inibidor de receptor de tirosina quinase	Câncer metastático da tireóide medular
Vandetanib	Inibidor de receptor de tirosina quinase	Câncer medular da tireóide
Talidomida	Inibidor da fosforilação de Akt	Mieloma múltiplo (em combinação com Dexametasona)

FONTE: Adaptado de Al-Abd et al. (2017).

É importante ressaltar que nem todas as células cancerígenas malignas podem ocasionar metástase, uma vez que a indução de tal processo depende também de características relacionadas ao microambiente tumoral

(MANTOVANI, 2009). Além disso, qualquer falha em uma das etapas pode ser capaz de interromper o processo metastático (DUFFY, 1996).

3.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

3.3.1 Apoptose

A apoptose é descrita como um mecanismo de morte celular altamente regulado e programado, que pode ocorrer tanto em situações fisiológicas como patológicas. Fisiologicamente, o desencadeamento da apoptose resulta na eliminação de células geneticamente danificadas ou não mais necessárias para o organismo, a fim de garantir a manutenção da homeostase tecidual (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003; FINK; COOKSON, 2005; ANAZETTI; MELO, 2007; HASSAN et al., 2014; PISTRITTO et al., 2016; XU; LAI; HUA, 2019). Entretanto, o funcionamento anormal do processo apoptótico (exacerbação ou inibição) pode levar ao desenvolvimento de diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas, distúrbios auto-imunes e até mesmo o câncer, contribuindo também para sua progressão (KASIBHATLA; TSENG, 2003; ELMORE, 2007).

Em termos morfológicos, células em apoptose sofrem alterações características que incluem: condensação citoplasmática e da cromatina, arredondamento celular, ativação de endonucleases que causam a fragmentação do DNA e formação de *blebbings* citoplasmáticos que dão origem a corpos apoptóticos, os quais posteriormente são fagocitados por macrófagos (ELMORE, 2007; ANAZETTI; MELO, 2007; LI; YUAN, 2008; WLODKOWIC et al., 2011; VINAY et al., 2013), conforme demonstrado na Figura 3.

Diferente de outros mecanismos de morte, a apoptose não apresenta nenhuma reação inflamatória associada. Isso se deve à ausência de extravasamento de constituintes celulares para o tecido intersticial e a rápida fagocitose dos corpos apoptóticos, não havendo a liberação de citocinas relacionadas ao processo inflamatório (ELMORE, 2007; VINAY et al., 2013).

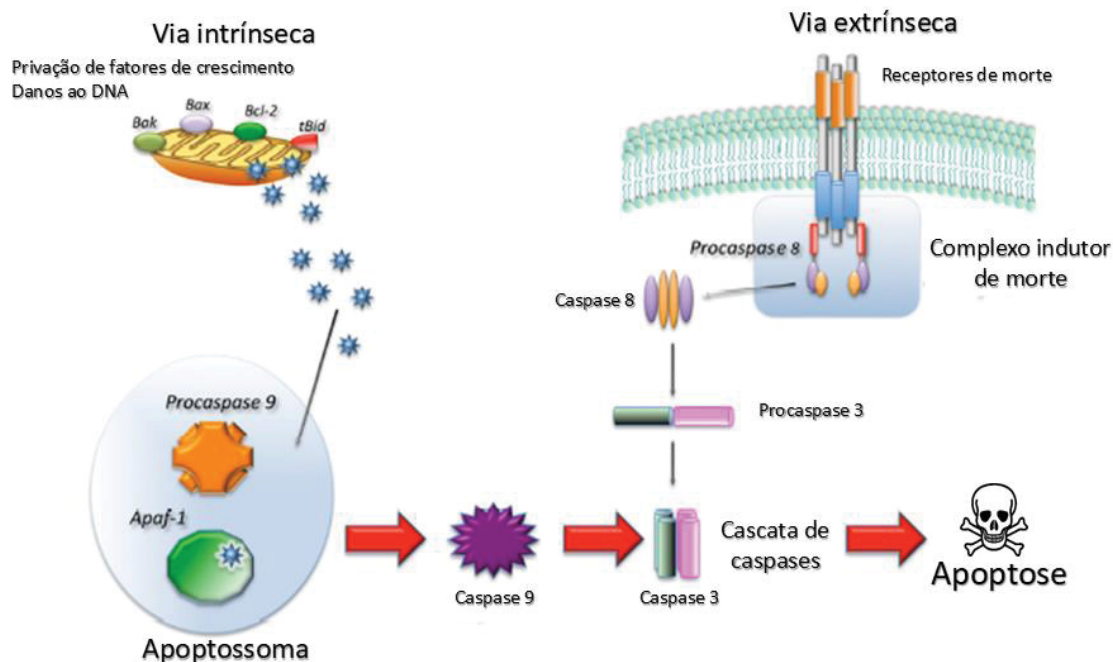
O mecanismo de apoptose resulta da ativação de enzimas denominadas caspases, as quais são classificadas como iniciadoras (caspase-1, 2, 4, 5, 8, 9,

10, 11 e 12) e efetoras (caspase-3, 6 e 7). Elas são sintetizadas como zimógenos inativos contendo, um pró-domínio, uma subunidade grande p20 e uma pequena p10. As caspases iniciadoras possuem prodôminios longos que contêm o domínio efetor da morte (DED) ou o domínio de recrutamento da caspase (CARD), enquanto as executoras possuem prodôminios curtos. A ativação enzimática ocorre por clivagem proteolítica que resulta na separação das subunidades e remoção do prodôminio (LI; YUAN, 2008; VINAY et al., 2013).

Classicamente, a apoptose pode ser desencadeada pela ocorrência da via extrínseca ou citoplasmática e da via intrínseca ou mitocondrial (Figura 2). A via extrínseca é ativada através da ligação de proteínas sinalizadoras extracelulares, como o fator de necrose tumoral (TNF), ligante Fas (Fas-L) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), em receptores transmembranares TNF tipo 1 (TNFR1), Fas (também chamados CD95 / Apo-1) e TRAIL, conhecidos como receptores de morte. A ligação resulta na formação do complexo indutor de morte (DISC), que leva à ativação de caspases iniciadoras (normalmente caspase-8), as quais, por sua vez, ativam caspases executoras (particularmente caspase-3 ou 7), levando à apoptose (KIECHLE; ZHANG, 2002; VINAY et al., 2013, JAN; CHAUDHRY, 2019).

A via intrínseca é ativada principalmente em resposta a privação de fatores de crescimento e danos ao DNA causados por toxinas, estresse oxidativo ou radiação, que culminam na permeabilização da membrana mitocondrial, favorecendo a liberação do citocromo c para o citoplasma, o qual, na presença de dATP/ATP, se liga ao fator de ativação 1 da protease apoptótica (Apaf-1), formando um complexo chamado apoptossoma. Este complexo ativa a caspase iniciadora 9, que por sua vez, ativa caspases efetoras como a 3 e 7, desencadeando a morte celular por apoptose (ANAZETTI; MELO, 2007; LI; YUAN, 2008; FAVOLORO et al., 2012, VINAY et al., 2013).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS VIAS MOLECULARES QUE LEVAM À APOPTOSE.



FONTE: Adaptado de favaloro et al. (2012).

NOTA: Na via extrínseca, após a ligação do ligante no receptor de morte, o complexo indutor de morte é formado e a caspase iniciadora 8 é ativada. Na via intrínseca, a liberação do citocromo c da mitocôndria resulta na formação do apoptossoma e ativação da caspase-9. A caspase-8 e 9 ativam caspases efetoras, como a caspase-3, resultando em morte celular.

A via intrínseca da apoptose é regulada pela ação de proteínas pró e anti apoptóticas da família Bcl-2. Proteínas pró-apoptóticas desta família, como Bax e Bak promovem a permeabilização da membrana mitocondrial mediando a formação de poros, favorecendo o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas e mediando a ocorrência da via intrínseca. Já proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, tais como Bcl-2, Bcl-XL e Bcl-w, impedem a ativação da via intrínseca ao evitar a formação de poros mitocondriais e consequentemente, a liberação de citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas para o citosol (VINAY et al., 2013; ANAZETTI; MELO, 2007, KIECHLE; ZHANG, 2002).

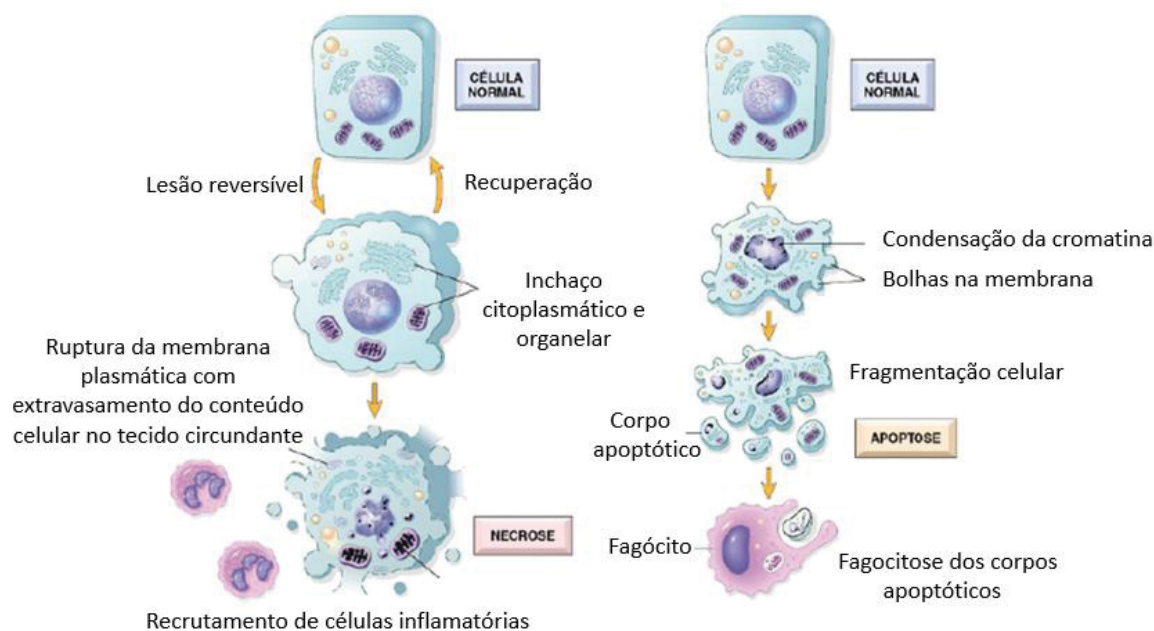
3.3.2 Necrose

A necrose é descrita como um processo de morte celular acidental, iniciado em resposta a danos físicos, lesões químicas, choque osmótico e outros estímulos traumáticos. É caracterizada morfológicamente pelo inchaço citoplasmático e organelar, formação de vacúolos no citosol, ruptura da

membrana plasmática com extravasamento do conteúdo celular no tecido circundante e consequente recrutamento de células inflamatórias (HAANEN; VERMES, 1995; KASHIBATLA; TSENG, 2003; BERGHE et al., 2013; JAN; CHAUDHRY, 2019).

A necrose pode causar danos teciduais, injúria e até mesmo morte de células vizinhas em consequência do desencadeamento do processo inflamatório (HAANEN; VERMES, 1995; KASHIBATLA; TSENG, 2003; ANAZETTI; MELO, 2007; BERGHE et al., 2013) conforme demonstrado na Figura 3.

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CARACTERÍSTICAS CELULARES DA NECROSE (ESQUERDA) E APOPTOSE (DIREITA).



FONTE: Adaptado de Vinay et al. (2013).

3.3.3 Outros tipos de morte celular

Além da morte celular por apoptose, atualizações do Comitê de Nomenclatura de morte celular (GALLUZZI et al., 2018), preconiza a existência de mais dez tipos de morte celular regulada (RCD), cujas principais características moleculares e bioquímicas estão apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – PRINCIPAIS TIPOS DE MORTE CELULAR PROGRAMADA E SUAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS (CONTINUA).

Tipo de morte	Características morfológicas	Características bioquímicas
Necroptose	Inchaço celular; ruptura da membrana plasmática; condensação moderada de cromatina	Ativação de RIPK1, RIPK3 e MLKL; formação de necrossomas citosólicos
Piroptose	Ausência de inchaço celular; ruptura da membrana plasmática; condensação moderada de cromatina	Ativação de CASP1, CASP3 e GSDMD; clivagem de GSDMD; formação de poros induzida por GSDMD-N; liberação de IL1B
Ferroptose	Mitocôndrias menores; crista mitocondrial reduzida; densidades elevadas da membrana mitocondrial; aumento da ruptura da membrana mitocondrial	Acúmulo de ferro; peroxidação lipídica; Dissipação de $\Delta\Psi_m$; conversão de MAP1LC3B-I em MAP1LC3B-II; glutaminólise; independente de caspase
Parthanatos	Condensação da cromatina; grande fragmentação do DNA; ausência de corpos apoptóticos e fragmentos de DNA em pequena escala; perda de integridade da membrana; ausência de inchaço celular	Ativação excessiva de PARP1; dissipação de $\Delta\Psi_m$; independente de caspase; esgotamento de NAD ⁺ e ATP; acumulação de polímeros de poli-ADP-ribose; liberação de AIFM1 das mitocôndrias ao núcleo
Morte celular entótica	Estrutura célula a célula	Ativação de proteínas de adesão e actomiosina; fagocitose associada a LC3
Morte celular netótica	Ruptura de membrana plasmática; colapso da membrana nuclear; liberação de fibra de cromatina	Formação de NETs; liberação e translocação de enzimas granulares; citrulinização de histonas
Morte celular dependente de lisossomo	Ruptura de lisossomo e membrana plasmática	Permeabilização da membrana lisossômica; liberação de enzimas hidrolíticas lisossômicas; lesão oxidativa induzida por ferro lisossômico

TABELA 2 – PRINCIPAIS TIPOS DE MORTE CELULAR PROGRAMADA E SUAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS (CONCLUSÃO).

Tipo de morte	Características morfológicas	Características bioquímicas
Morte celular dependente de autofagia	Vacuolização autofágica	Conversão de MAP1LC3B-I em MAP1LC3B-II; aumento do fluxo autofágico e atividade lisossômica
Necrose conduzida por transição de permeabilidade mitocondrial (MPT)	Morfologia necrótica	Perda abrupta da impermeabilidade da membrana mitocondrial interna em pequenos solutos, resultando em rápida dissipação de $\Delta\psi_m$, quebra osmótica de ambas as membranas mitocondriais
Morte celular imunogênica	Morfologia apoptótica	Liberação oportuna de uma série de padrões moleculares associados a danos, reconhecidos por receptores de reconhecimento de patógenos expresso por componentes inatos e adaptativos do sistema imunológico, que alertam o organismo para uma situação de perigo, resultando na obtenção de uma resposta imune geralmente associada ao estabelecimento da memória imunológica

FONTE: Adaptado de Tang et al. (2019).

3.4 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

A relação entre câncer e inflamação foi hipotetizada pela primeira vez em 1863, por Rudolf Virchow, o qual identificou a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Atualmente, são estabelecidas duas principais vias que conectam o câncer a inflamação. A primeira, chamada de via extrínseca, é estimulada por condições inflamatórias externas responsáveis por aumentar o risco de desenvolvimento do câncer (Tabela 3).

TABELA 3 – CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS ASSOCIADAS A NEOPLASIAS.

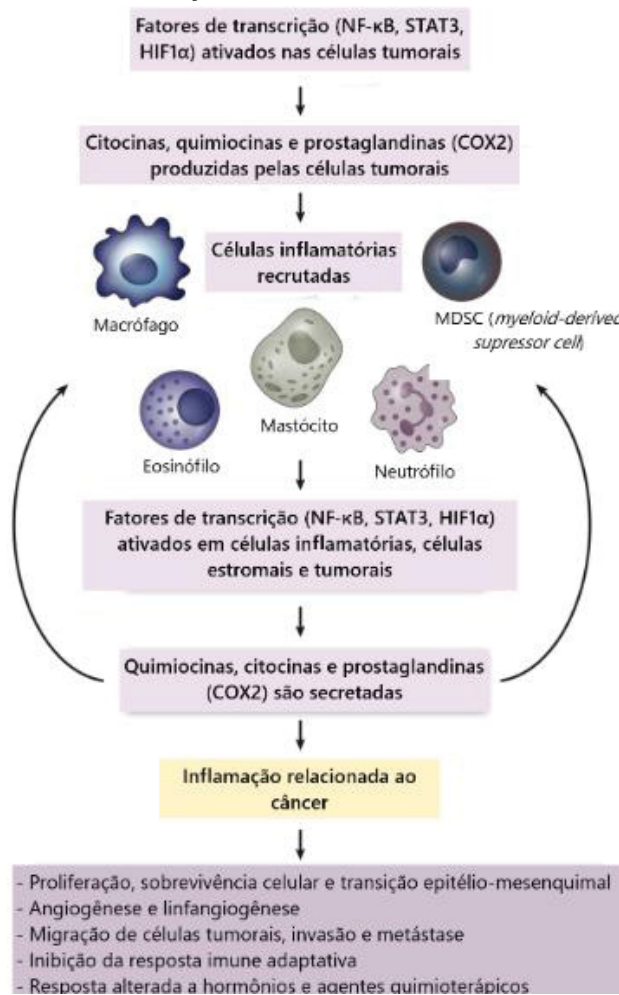
Condição patológica	Neoplasia associada	Agente etiológico
Asbestose/silicose	Câncer de pulmão	Fibras de amianto; partículas de sílica
Bronquite	Câncer de pulmão	Sílica; amianto; fumo
Cistite	Câncer na bexiga	Catéteres urinários
Gengivite	Câncer de boca	-
Doenças inflamatórias intestinais	Câncer colorretal	-
Líquen escleroso	Câncer de vulva	-
Pancreatite crônica; pancreatite hereditária	Câncer de pâncreas	Alcoolismo
Esofagite de refluxo; esôfago de Barrett	Câncer no esôfago	Ácido gástrico
Sialadenite	Câncer de glândulas salivares	-
Síndrome de Hashimoto	Linfoma do tecido linfóide associado à mucosa	-
Inflamação cutânea	Melanoma	Luz ultravioleta
Colangite	Câncer de cólon	Ácidos biliares
Colecistite crônica	Câncer da vesícula biliar	Bactérias e pedras na vesícula biliar
Gastrite/úlcera	Câncer gástrico	<i>Helicobacter pylori</i>
Hepatite	Câncer de fígado	Vírus da hepatite C e B
Mononucleose	Linfoma de Burkitt	Vírus de Epstein Barr
AIDS	Sarcoma de Kaposi	Vírus da imunodeficiência humana
Osteomielite	Câncer de pele na drenagem dos seios da face	Infecção bacteriana
Doença inflamatória pélvica	Câncer de ovário, cervical e anal	Gonorréia; clamídia; papilomavírus humano
Cistite crônica	Câncer de bexiga, fígado e reto	Esquistossomose

FONTE: Adaptado de Coussens e Werb (2002).

A segunda, chamada de via intrínseca (Figura 4), resulta de alterações genéticas, como a ativação de oncogenes, que modulam a criação e estabelecimento de um microambiente tumoral inflamatório ideal para a

sobrevivência, proliferação e metástase das células tumorais (MANTOVANI et al., 2008; MUNN, 2017; CASEY et al., 2015).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA INTRÍNSECA QUE CONECTA A INFLAMAÇÃO E A CARCINOGENESE.



FONTE: Adaptado de Mantovani et al (2008).

Neste sentido, tem sido observado que durante a tumorigênese ocorre a ativação de fatores de transcrição relacionados a vias inflamatórias, tais como NFκB, STAT3 e HIF1-α, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-8, TNF-α, quimiocinas e prostaglandinas, as quais por sua vez recrutam células inflamatórias para o microambiente tumoral. Tais células inflamatórias, bem como as células tumorais, continuam a produzir os mediadores supracitados, levando a um microambiente inflamatório adequado para a progressão e desenvolvimento dos tumores (MANTOVANI et al., 2008; BALKWILL; MANTOVANI, 2001; MUNN, 2017).

O papel dos principais fatores de transcrição e mediadores relacionados ao processo inflamatório na carcinogênese (citocinas e quimiocinas) está descrito na Tabela 4.

TABELA 4 – PRINCIPAIS CITOCINAS E QUIMIOCINAS QUE VINCULAM CÂNCER À INFLAMAÇÃO E SUAS FUNÇÕES.

Principais citocinas e quimiocinas	Funções
<i>Citocinas</i>	
IL-6	Promove o crescimento tumoral
TNF- α	Induz dano e inibe o reparo do DNA; promove o crescimento tumoral; induz fatores angiogênicos
<i>Quimiocinas</i>	
NF- κ B	Facilita a invasão e metástase, direcionando a migração de células tumorais e promovendo a degradação da membrana basal; medeia o progresso da inflamação, promovendo a inflamação crônica; promove a produção de espécies reativas mutagênicas de oxigênio; protege as células transformadas da apoptose
iNOS	Induz dano ao DNA e interrompe a resposta ao dano ao DNA; regula a angiogênese e metástase; <i>downstream</i> de TNF- α e citocinas pró-inflamatórias
HIF- α	Promove a inflamação crônica induzida por citocinas pró-inflamatórias através de NF- κ B; aumenta a atividade glicolítica das células cancerígenas; contribui para a angiogênese, invasão tumoral e metástase ao ativar o VEGF
STAT3	Ativado por citocinas pró-inflamatórias, promove proliferação, resistência à apoptose e tolerância imunológica
Nrf2	Atividade anti-inflamatória; proteger contra danos no DNA
NFAT	Regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias; necessário na transformação de células

FONTE: Adaptado de Lu, Ouyang e Huang (2006).

Durante a inflamação, a infiltração de células imunes, como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, está associada à geração de óxido nítrico (QU; TANG; HUA, 2018), um mediador intimamente relacionado ao processo inflamatório e a carcinogênese (REUTER et al., 2010).

O ON é uma molécula produzida por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): nNOS ou NOS1, iNOS ou NOS2 e eNOS ou NOS3 (WINK

et al., 1998). A nNOS e eNOS sintetizadas em neurônios e células endoteliais, são capazes de produzir pequenas quantidades de ON por um curto período de tempo, enquanto a iNOS é ativada por macrófagos e citocinas inflamatórias produzem altas concentrações de ON por longos períodos de tempo (WINK et al., 1998; XIE; FIDLER, 1998).

Estudos demonstram que o ON pode exercer tanto efeito pró como antitumorigênico, dependendo de fatores relacionados ao microambiente tumoral, os quais incluem a concentração de ON, o tipo de célula em que o ON está atuando e a capacidade adaptativa da mesma (HUSSAIN et al., 2008; BURKE et al., 2013).

Foi demonstrado que o ON é capaz de sensibilizar células tumorais à apoptose mediado por TRAIL através do aumento da expressão de I κ B α , um inibidor específico de NF-kB. Além disso, um estudo realizado por Garbán e Bonavida (1999) observou que o tratamento de células de câncer de ovário (AD10 e A2780) com ON exógeno e induzido por interferon-gama (IFN- γ) foi capaz de regular positivamente a expressão do gene Fas, sensibilizando as células a apoptose.

Em contrapartida, diversos tipos de câncer, incluindo câncer de cabeça e pescoço (GALLO et al., 1998), cólon (SIEGERT et al., 2002), pulmão (SANUPHAN et al., 2013) e mama (GLYNN et al., 2010), demonstraram uma forte correlação entre altos níveis de iNOS (e consequentemente de ON), e a indução da angiogênese, invasão e metástase tumoral.

Entre os mecanismos mais bem consolidados relacionados ao efeito pró-tumoral do ON está a regulação positiva do VEGF, que estimula a angiogênese, resultando em uma maior densidade vascular e aumentando a probabilidade das células tumorais se disseminarem para sítios secundários (VAKKALA et al., 2000; BURKE et al., 2013). Outro mecanismo que pode promover a progressão tumoral induzida por ON, é a ativação da COX-2, a qual acarreta na síntese de prostaglandinas, que por sua vez podem induzir a ocorrência de angiogênese e a indução de fatores de crescimento (LALA; CHAKRABORTY, 2001).

Além disso foi observado que a alta produção de ON é capaz de inibir a ativação de caspases via supressão da expressão de Bax e, consequentemente, antagonizar os sinais pró-apoptóticos (BLAISE et al., 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que o ON é capaz de estimular a migração de células tumorais. Foi

verificado que níveis elevados de iNOS no microambiente tumoral contribuem para a migração de células NCI-H460 (câncer de pulmão) via regulação positiva da expressão de caveolina-1 (Cav-1), culminando na ativação das vias da FAK e da Akt, e favorecendo a diminuição da apoptose e o rápido desenvolvimento tumoral (SANUPHAN et al., 2013; HUSSAIN et al., 2008).

Em relação ao CCR, tem sido observado que o gene da COX-2 está superexpressado em aproximadamente 86% dos carcinomas (PARREIRAS et al., 2013), evidenciando a influência da inflamação no desenvolvimento e progressão deste tipo de tumor.

Devido ao papel crucial da inflamação no desenvolvimento e progressão tumoral, diversos compostos e produtos naturais com capacidade de afetar a produção e/ou ativação dos principais fatores de transcrição, quimiocinas e citocinas do processo inflamatório, diretamente em células tumorais ou demais tipos celulares presentes no microambiente, têm sido investigados acerca de seu potencial antitumoral (NAM, 2006; FURQAN et al., 2013; ROSSI et al., 2015; YU; TANG; SUN, 2017; VOURI; HAFIZI, 2017). Nesse sentido, a Tabela 5 mostra os agentes anti-inflamatórios mais promissores, os quais foram submetidos a ensaios clínicos.

TABELA 5 – AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS TESTADOS EM ENSAIOS CLÍNICOS EM PACIENTES COM CÂNCER.

Fármacos	Alvo inflamatório	Classe do fármaco	Tipo de tumor
Infliximabe	TNF- α	Anticorpo quimérico específico para TNF- α	Câncer de rim e pâncreas
Etanercepte	TNF- α	Proteína de fusão TNFR2–Fc humana	Câncer de mama e ovário
Siltuximabe	IL-6	Anticorpo quimérico anti-IL-6	Câncer de próstata, rim, ovário e mieloma múltiplo
Tocilizumabe	IL-6	Anticorpo específico para IL-6R humano	Câncer de ovário
Carlumabe	CCL2	Anticorpo humano anti-CCL2	Câncer de próstata
MABp1	IL-1 α	Anticorpo anti-IL-1 α humano verdadeiro	Câncer colorretal
Reparixina	CXCR1/2	Inibidor de moléculas pequenas	Câncer de mama
Plerixafor	CXCR4	Inibidor de moléculas pequenas	Câncer de ovário, pâncreas e colorretal
Ruxolitinibe	JAK1/2	Inibidor de moléculas pequenas	Mielofibrose
Pacritinibe	JAK2	Inibidor de moléculas pequenas	Câncer colorretal, linfoma e mielofibrose
Bortezomibe	NF- κ B	Inibidor de proteossomo	Linfoma de células do manto e mieloma múltiplo
Trabectedina	TAMS	Citotoxicidade seletiva de monócitos/macrófagos	Sarcoma
CP- 870,893	CD40	Anticorpo agonista de CD40 humano	Câncer pancreático
Tasquinimod	MDSCs	Quinolona-3-carboxamida	Câncer de próstata

FONTE: Adaptado de Crusz e Balkwill (2015).

3.5 *Lafoensia pacari* A. St.– Hil., LYTHRACEAE

Lafoensia pacari A. St.-Hil é uma planta arbórea, descrita pelo botânico francês Auguste de Saint Hilaire em 1818 e pertencente à família Lythraceae. Popularmente, a *L. pacari* é conhecida como dedaleiro, mangava brava ou pacari (SANTOS, 2006; SCHEER, et al., 2012; FIRMO; MIRANDA; OLEA, 2016).

A espécie distribui-se geograficamente pela América do Sul e América Central. Pode ser encontrada no Paraguai, Bolívia e nos seguintes Estados

brasileiros: Bahia, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Amapá, Pará e Rio Grande do Sul. Ocorre em áreas de mata ciliar, mata seca, e principalmente no cerrado e florestas de altitudes (SANTOS; COELHO; PIRANI, 2009; PASA; CABRAL, 2009).

É uma árvore que mede em torno de 5 a 15 metros de altura, podendo atingir até 25 m. Seu tronco possui de 30 a 60 cm de diâmetro e formato cilíndrico, reto ou levemente tortuoso com ramificação cimosa (Figura 5), em forquilha com copa arredondada, umbeliforme, larga e densifoliada (SANTOS, 2006; FIRMO; MIRANDA; OLEA, 2016).

As flores são grandes, com receptáculo desenvolvido de até 8 cm de diâmetro com até 16 pétalas livres de cor branco-amarelada e numerosos estames com anteras razoavelmente grandes (PASA; CABRAL, 2009; FIRMO; MIRANDA; OLEA, 2016). As folhas são opostas, simples, de textura coriácea, simétricas, de forma oblongo-oval, com ápice praticamente obtuso, base aguda e pecíolo curto e medem entre 5 a 9 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura (MUNDO; DUARTE, 2007).

As sementes de *L. pacari* são pardo-amareladas, com ala oblonga, medindo 1,96 cm de comprimento, 0,74 cm de largura e 0,04 cm de espessura em média (FERNANDES et al., 2012). A casca externa (ritidoma) possui espessura de até 20 mm, cinzenta, rugosa, com cicatrizes e sulcos rasos longitudinais e quando velha apresenta fendas longitudinais mais profundas (SANTOS, 2006).

Seus frutos são cápsulas conspícuas semi-lenhosas, semiglobosas (Figura 5), com sementes aladas que medem de 4 a 8 cm de comprimento por 2,3 a 5,3 cm de diâmetro (PASA; CABRAL, 2009; SANTOS, 2006). A coleta deve ser realizada quando os frutos apresentarem coloração amarelo parda e início da abertura espontânea, entre os meses de março a outubro se a árvore estiver na formação florestal (OLIVEIRA et al., 2016).

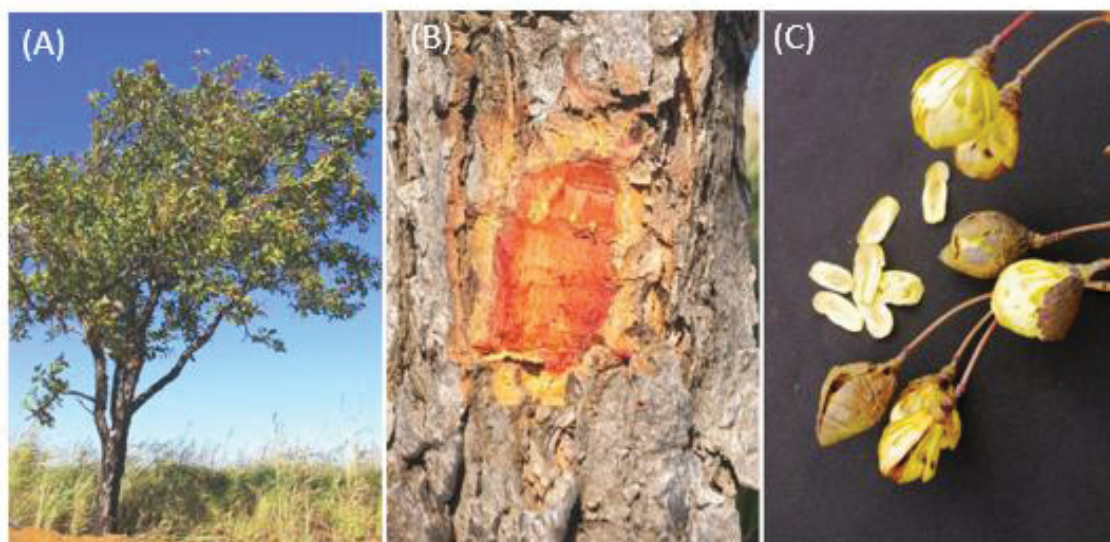
Sua madeira é utilizada na construção civil, em obras externas e internas, marcenaria, tacos para assoalho, moirões, cabos de ferramentas, construção civil e tabuados em geral, além do seu potencial para paisagismo e recuperação de áreas degradadas (SCHEER et al., 2012; FIRMO; MIRANDA; OLEA, 2016).

A *Lafoensia pacari* destaca-se como uma planta promissora em virtude do seu grande valor medicinal. É popularmente utilizada no tratamento de coceiras, feridas, dores de estômago, úlceras, gastrite e até mesmo no tratamento do câncer (SANTOS; COELHO; PIRANI, 2009; PASA; CABRAL, 2009; DE MELO et al., 2011).

Em relação a sua composição química, estudos evidenciam a presença de saponinas, ácido gálico, ácido elágico e derivados, catequinas, taninos hidrolisáveis, esteroides, triterpenos e alcaloides na casca da planta (FIRMO; MIRANDA; OLEA, 2016; REICHERT et al., 2018; ATHERINO, 2019). Nas folhas da planta foram identificados compostos polifenólicos, flavonoides e taninos como ácido elágico e punicalagina (SAMPAIO et al., 2011; CARNEIRO et al., 2016).

Extratos de *L. pacari* têm sido extensivamente estudados quanto ao seu potencial terapêutico. As atividades farmacológicas cientificamente comprovadas da planta, bem como as substâncias as quais estes efeitos podem ser atribuídos estão apresentados na Tabela 6.

FIGURA 5 – ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Lafoensia pacari* A. St.- Hil.



FONTE: Árvores do bioma cerrado (2020).

LEGENDA: (A) Aspecto geral; (B) Casca do caule; (C) Frutos maduros

TABELA 6 – PANORAMA DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Lafoensia pacari* E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ASSOCIADAS A ESSES EFEITOS.

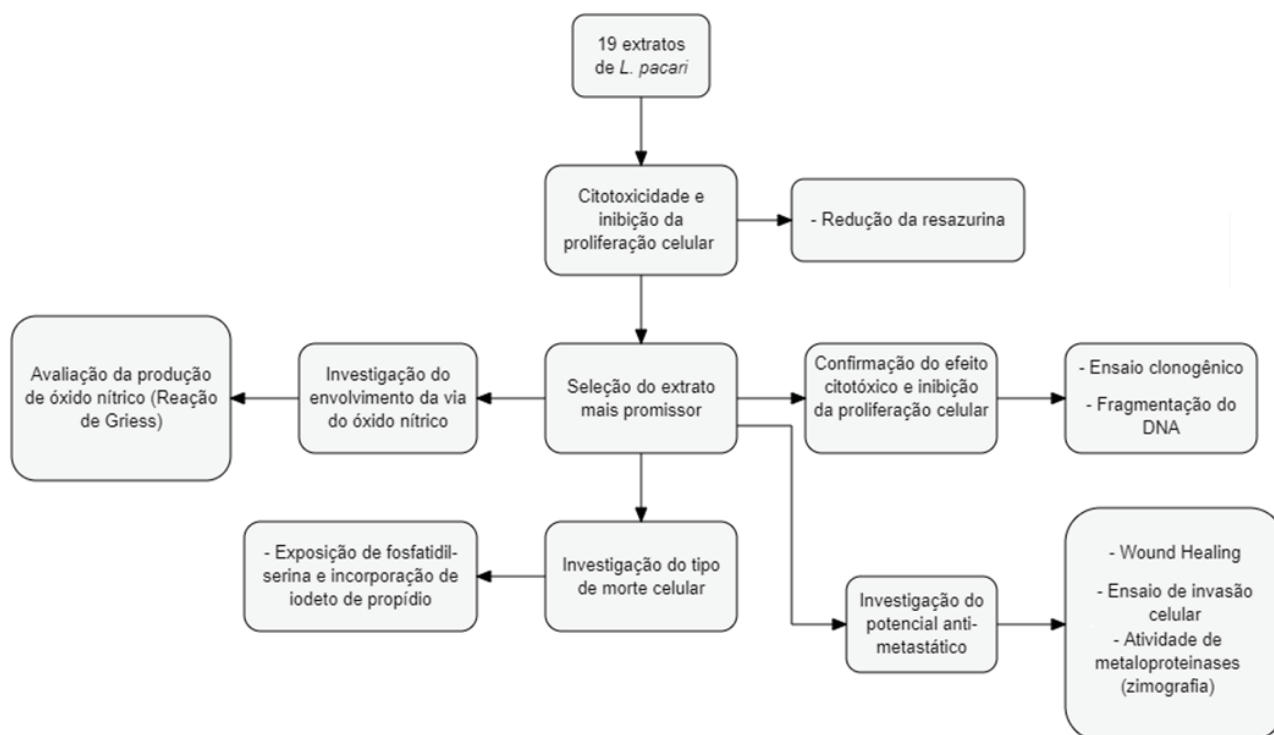
Autores	Modelo do ensaio	Parte usada	Atividade farmacológica	Substâncias químicas
Pereira et al. (2018) Carneiro et al. (2016)	<i>In vivo</i>	Folhas	Cicatrizante; anti-inflamatória; antioxidante; efeito quimiopreventivo e angiogênico	Ácido elágico; punicalagina; punicalina; canferol; Quercetina 3-O-xilopiranosideo; Quercetina-3-O-ramnopiranosideo
Muller et al. (2007) Porfírio et al. (2009)	<i>In vitro</i>	Folhas	Antiviral e bactericida	-
Solon et al., 2000 Marcondes et al. (2014) Reichert et al. (2018) De Lima et al. (2006) Silva Júnior et al. (2010) Atherino (2019)	<i>In vitro</i>	Cascas	Efeito antioxidante; citotoxicidade e atividade antiproliferativa em diversas linhagens celulares tumorais; ação bactericida e antifúngica	Ácido elágico e conteúdo misto de elagitaninos
Tamashiro Filho et al. (2012) Rogério et al., (2006) Nascimento et al. (2011) De matos, 2008 Galdino et al. (2010) Galdino et al. (2009) Marcondes et al. (2014)	<i>In vivo</i>	Cascas	Efeito preventivo e curativo sobre úlceras gástricas; atividade analgésica; ação anti-edematosa; anti-inflamatória; ansiolítica; efeito antidepressivo	Ácido elágico
Mota Menezes et al. (2006)	Clínico	Cascas	Alívio dos sintomas dispépticos de pacientes infectados com <i>H. pylori</i>	-

FONTE: O autor (2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia experimental adotada para a execução deste trabalho, está descrita na Figura 6.

FIGURA 6 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOTADA PARA A INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO/ANTIPROLIFERATIVO E ANTI-METASTÁTICO *IN VITRO* DOS 19 EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS CASCAS DE *L. pacari*.



FONTE: O autor (2020).

4.1 REAGENTES

O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos para a cultura de células foram obtidos da Gibco (EUA). A matriz da membrana basal com atividade biológica (matrigel) e a albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O coquetel inibidor de proteases foi adquirido da GE Healthcare Bio-Sciences Corp. (USA). O kit *Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis* foi obtido da Invitrogen (Thermo Fisher Scientific - EUA). O sal resazurina e o fluoróforo 7-aminoactinomicina D (7-AAD) foram obtidos da INLAB (Brazil) e BD Biosciences (EUA), respectivamente. Todos os demais produtos químicos foram obtidos de reagentes de grau de pureza ACS.

4.2 MATERIAL BOTÂNICO

Os extratos de *L. pacari* utilizados neste estudo foram produzidos e gentilmente cedidos pela Dr^a. Cristiane Loiva Reichert e pelo Prof. Dr^o Cid Aimbiré de Moraes Santos do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O material vegetal foi coletado na Fazenda da Mata, localizada no município de Maracaju-MS (21°45'37,4" S, 55°21'81,9" WO) em maio de 2011. A espécie vegetal foi identificada como sendo *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, sendo uma exsicata depositada no Herbário Per Kar Dusén, da Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba - PR, sob o número MBM11065.

As cascas do caule de *L. pacari* foram secas por cinco dias à temperatura ambiente e posteriormente por três dias à temperatura de 60 °C. A seguir, o material vegetal foi triturado e tamisado, sendo o pó obtido (< 0,425 mm) armazenado em temperatura ambiente e protegido da luz.

Os extratos foram obtidos por maceração de 10 g do pó das cascas da árvore em 100 mL de líquido extrator (água, metanol, acetona, etanol ou misturas destes) pelo período de 24 h. Posteriormente, os extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 60°C, liofilizados e conservados a temperatura de 4-8 °C até o momento do uso.

A proporção dos solventes foi determinada pelo método Simplex Centroid Design, com auxílio do software Design-Expert 7.0.0, resultando em 19 combinações de extratos (Tabela 7).

Por fim, cabe ressaltar que o presente projeto foi devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob número AB3EA44.

TABELA 7 – RELAÇÃO DE EXTRATOS OBTIDOS COM DIFERENTES LÍQUIDOS EXTRATORES PELO MÉTODO SIMPLEX CENTROID DESIGN.

Extratos	Líquido extrator	Proporção (% v/v)	Rendimento (% p/p)
E-1	água	100	20,80
E-2	metanol : etanol	50 : 50	30,00
E-3	metanol : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	30,40
E-4	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 62,5 : 12,5 : 12,5	33,20
E-5	metanol	100	24,60
E-6	água : metanol	50 : 50	28,70
E-7	água : acetona	50 : 50	35,70
E-8	água : metanol : acetona : etanol	62,5 : 12,5 : 12,5 : 12,5	28,80
E-9	água : etanol	50 : 50	29,90
E-10	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 62,5 : 12,5	32,70
E-11	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 12,5 : 62,5	32,60
E-12	etanol	100	26,40
E-13	água : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	34,60
E-14	água : metanol : acetona : etanol	25 : 25 : 25 : 25	34,80
E-15	acetona : etanol	50 : 50	40,70
E-16	acetona	100	16,50
E-17	água : metanol : acetona	33,33 : 33,33 : 33,33	28,90
E-18	água : metanol : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	28,30
E-19	metanol : acetona	50 : 50	31,00

FONTE: O autor (2020).

4.3 CULTIVO DE CÉLULAS

As células da linhagem HRT-18 (carcinoma colorretal humano - 86040306) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem celular McCoy (fibroblasto murino - 0160) foi obtida no Instituto Adolfo Lutz.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução de antibióticos contendo penicilina e estreptomicina (10.000 U/mL - GIBCO, Baltimore, EUA).

As células foram mantidas em estufa, à temperatura de 37 °C e em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo

4.4.1.1 Redução da resazurina (Alamar Blue®)

A viabilidade metabólica das linhagens HRT-18 e McCoy foi avaliada pelo ensaio de redução da resazurina segundo protocolo proposto por Czekanska (2011), com modificações.

As células foram semeadas em placa de 96 poços ($6,4 \times 10^3$ células/cm²), em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h para adesão celular.

Transcorrido esse período de tempo, as células foram tratadas por 72 h com diferentes concentrações dos 19 extratos de *L. pacari* (1 – 50 µg/mL) ou de 5-fluorouracil (0,125 – 8 nM) utilizado como controle positivo. Para o controle negativo, as linhagens celulares foram tratadas com o veículo das diluições dos extratos (solução de dimetilsulfóxido – DMSO (0,08%) em meio de cultivo completo).

Três horas previamente ao término do tratamento, foi adicionado aos poços, 20 µL da solução de resazurina (440 µM), sendo a placa novamente incubada em estufa até completar as 72 h de tratamento. Posteriormente, a placa foi agitada e realizada sua leitura, em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) nos filtros de 570 nm e 620 nm.

Para cada placa com células, outra equivalente sem células foi manipulada nas mesmas condições citadas anteriormente para ser utilizada como branco.

O percentual de redução da resazurina foi calculado através das seguintes fórmulas:

$$\text{Fator de correção (Ro)} = \frac{\text{Abs 570 nm branco CR} + \text{resazurina}}{\text{Abs 620 nm branco CR} + \text{resazurina}}$$

Branco CR: poço com o meio de cultura, sem células e sem tratamento, incubado com a resazurina.

$$\text{Red. resazurina} = \left[(\text{Abs 570 nm} - \text{Abs 570 nm branco SR}) - (\text{Abs 620 nm} - \text{Abs 620 nm branco SR}) \right] \times Ro$$

Branco SR: poço com o meio de cultura, sem células e com tratamento, incubado sem a resazurina

$$\% \text{ de redução de resazurina} = 100 \times \frac{\text{Redução da resazurina do grupo tratado}}{\text{Redução da resazurina do grupo controle}}$$

Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.1.2 Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado segundo Badisa et al. (2009), considerando a relação entre a concentração inibitória média (CI₅₀) das células normais e tumorais, previamente determinadas pelo ensaio de redução da resazurina.

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ do extrato na célula não tumoral}}{CI_{50} \text{ do extrato na célula tumoral}}$$

4.4.1.3 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

O ensaio clonogênico foi realizado de acordo com metodologia proposta por Franken e colaboradores (2006) com adaptações. Células HRT-18 foram semeadas em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, na densidade de 100 células por poço e incubadas em estufa pelo período de 24 h.

A seguir, as células foram tratadas com o extrato E-14 na concentração referente a CI₅₀ determinada pelo ensaio da resazurina (16 µg/mL) por 72 h. Células do controle negativo foram tratadas com o veículo (DMSO 0,04%) utilizado para diluição do extrato pelo mesmo período de tempo.

Transcorridas 72 h, retirou-se o meio de cultura dos poços, sendo os mesmos lavados com tampão fosfato-salina (PBS) por três vezes. As células foram reincubadas em estufa, em meio suplementado com 10% de SFB agora livre de extrato e/ou veículo, até verificação da formação de colônias.

Uma vez visualizadas as colônias, as mesmas foram fixadas com metanol 70% e coradas com uma solução de cristal violeta 0,2%. Registros fotográficos dos poços contendo as colônias foram realizados com o auxílio de um celular. As imagens foram analisadas pelo software Schiefer Counter® desenvolvido e descrito por Santos (2018). Os resultados foram expressos em número de colônias, área total ocupada

pelos clones e através da determinação do índice clonogênico. O índice clonogênico (IC) foi calculado da seguinte forma:

$$IC = (n^{\circ} \text{ de colônias pequenas} \times 1) + (n^{\circ} \text{ de colônias médias} \times 10) + (n^{\circ} \text{ de colônias grandes} \times 100)$$

Foram consideradas colônias pequenas, médias e grandes aquelas que apresentaram tamanho entre 1,0 a 9,9 x 10⁻⁶ cm², 1,0 a 9,9 x 10⁻⁵ cm² e 1,0 a 9,9 x 10⁻⁴ cm², respectivamente.

Por fim, para diferenciar a indução de efeito citotóxico do antiproliferativo, utilizou-se a classificação dos clones conforme seu tamanho (pequenos, médios e grandes). A redução do número de colônias, independentemente de seu tamanho, foi considerada indução de efeito citotóxico. Já a elevação do número de clones pequenos e/ou médios, foi considerada indução de efeito antiproliferativo. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.1.4 Avaliação da fragmentação do DNA

A avaliação da fragmentação do DNA foi realizada por meio de citometria de fluxo, utilizando-se o corante fluorescente 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Schmid et al., 1992).

Células HRT-18 foram semeadas em placas de 6 poços (densidade de 6,2 x 10³ células/cm²) em meio RPMI 1640, suplementado com 5% SFB e mantidas *overnight* em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram tratadas com E-14 (16 µg/mL) e incubadas durante 72 h em estufa nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 5 min a 1200 rpm, ressuspensas em 2 mL de PBS e contadas. Posteriormente, alíquotas contendo 5 x 10⁵ células foram novamente centrifugadas e permeabilizadas utilizando-se 300 µL de uma solução de triton X-100 (0,025%) em PBS. A seguir, adicionou-se às amostras, 5 µL de 7-AAD. As mesmas foram incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos a temperatura ambiente e lidas em citômetro de fluxo BD CALIBUR (BD Biosciences, New Jersey, EUA). Os resultados foram expressos como percentual de células que apresentaram o DNA fragmentado.

4.4.1.5 Determinação do tipo de morte celular induzida

A determinação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento das células HRT-18 com E-14 foi verificada através de citometria de fluxo, utilizando-se o kit *Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis*.

Células HRT-18 foram semeadas em placas de 6 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 5% SFB na densidade de $6,4 \times 10^3$ células/cm² e mantidas *overnight* em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram tratadas com E-14 (16 µg/mL) ou veículo de diluição do extrato e incubadas durante 72 h em estufa nas mesmas condições citadas anteriormente. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm, ressuspensas em 2 mL de PBS e contadas. Uma alíquota da suspensão celular (5×10^5 células) foi novamente centrifugada. As células foram ressuspensas em 100 µL de tampão (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl, pH 7,4), adicionados 1 µL de iodeto de propídeo e 5 µL de anexina a cada amostra. Após 15 minutos de repouso ao abrigo da luz, a fluorescência das células foi imediatamente determinada em citômetro de fluxo BD CALIBUR (BD Biosciences, New Jersey, EUA).

O tipo de morte celular induzida pelos tratamentos foi classificado conforme descrito a seguir: células marcadas apenas com anexina V foram consideradas em apoptose inicial; células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo foram consideradas em apoptose tardia/necrose secundária; células marcadas apenas com iodeto de propídeo foram consideradas em necrose primária. Os resultados foram expressos como percentual de células em apoptose inicial e tardia e em necrose.

4.4.2 Avaliação do potencial anti-metastático *in vitro*

4.4.2.1 Avaliação da migração celular – *wound healing*

Para avaliação da migração celular foi realizado o ensaio de *wound healing*, baseado no modelo descrito por Burk e colaboradores (1973) com adaptações. Células HRT-18 foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/cm² em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Tal densidade celular foi utilizada para que as células atingissem 100% de confluência após sua adesão, a

qual ocorreu mediante a manutenção das placas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 100 µL e uma lâmina, células foram removidas da monocamada de modo a formar uma fenda no centro do poço. Os poços foram lavados 2x com PBS a fim de retirar os fragmentos celulares removidos mecanicamente e, a seguir, adicionou-se aos mesmos os respectivos tratamentos. Os poços referentes ao grupo controle negativo, foram tratados com o veículo da diluição do extrato (DMSO 0,04% em meio de cultura completo). Já os destinados ao extrato teste, foram tratados com E-14 na concentração de 16 µg/mL. Cabe ressaltar que, para o tratamento, utilizou-se meio RPMI suplementado com 2,5% de SFB a fim de evitar a proliferação celular e observar apenas a migração das células.

O processo de migração celular foi acompanhado com o auxílio de um microscópio invertido (Bioval, serie XDS-1B), sendo devidamente registrado através da captura de imagens nos tempos 0, 24 e 48 h após a exposição das células ao tratamento.

A área da fenda foi mensurada utilizando-se o software ImageJ. Considerou-se a área do tempo 0 como 100% de inibição de migração, atribuindo-se valores percentuais em relação ao tempo 0 para a média das áreas mensuradas nos tempos de 24 e 48 h. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.4.2.2 Avaliação do potencial invasivo

O ensaio de invasão celular das células HRT-18 foi realizado de acordo com o método descrito por Hall e Brooks (2013) com modificações.

Para a realização do ensaio foram utilizados insertos para cultura de células contendo membrana de policarbonato com poro de 8 µM em placas de 24 poços. Em cada inserto foi adicionado 50 µL de Matrigel, previamente diluída em meio RPMI 1640 não suplementado, na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, células HRT-18 foram resuspensas na densidade de 1×10^5 células em 200 µL de meio RPMI 1640 sem soro, contendo DMSO 0,04% (veículo de diluição da fração) ou E-14 (16 µg/mL), de forma que a suspensão celular foi adicionada na porção superior de cada inserto, sobre a camada de Matrigel polimerizada. Abaixo de cada inserto foi adicionado 750 µL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SFB (agente quimioatratador) com a finalidade de viabilizar a invasão celular.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 48 h. Transcorrido esse período, removeu-se o meio presente na parte superior de cada inserto, sendo os mesmos lavados em PBS (2x). Posteriormente, as células presentes na membrana dos dispositivos foram expostas a uma solução de formaldeído 3,7% por 2 minutos e, a seguir, incubadas em metanol 100% por 20 minutos. Uma vez fixadas, as células foram coradas com solução de cristal violeta (0,2%) por 15 minutos. Finalmente, com o auxílio de um swab, eliminou-se as células e a matrigel que permaneceram na parte superior da membrana dos insertos. As células que migraram para a parte inferior da membrana dos dispositivos, e que portanto, apresentaram capacidade invasiva, foram registradas com o auxílio de um microscópio invertido (Bioval, serie XDS-1B) acoplado a uma câmara fotográfica.

Com o auxílio do software ImageJ foram contadas as células presentes em 5 campos microscópicos diferentes, determinando o número médio de células com capacidade invasiva. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.2.3 Avaliação da atividade de metaloproteinases - zimografia

A atividade de metaloproteinases foi avaliada por meio do ensaio de zimografia, conforme descrito por Hawkes, Li e Taniguchi (2001) com modificações. Para isso, células HRT-18 foram semeadas em garrafas de cultivo T-25 em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, na densidade de 8×10^3 células/cm² e incubadas em estufa pelo período de 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com o extrato E-14 na concentração de 16 µg/mL por 48 h. Células do controle negativo foram tratadas com o veículo (DMSO 0,04%) pelo mesmo período de tempo.

Transcorrido o período de tratamento, 2,5 mL do meio de cultura (sobrenadante) das garrafas foi retirado e submetido a centrifugação por 20 minutos a 4 °C em 8000 g. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 250 µL do sobrenadante e adicionou-se 25 µL de um *cocktail* de inibidores de proteases (livre de EDTA) e 125 µL de inibidor fosfatases (50 mM de NaF). O sobrenadante foi mantido em freezer -80 °C até a realização das análises.

Para a realização da eletroforese, foram aplicadas 30 µg de proteína de cada amostra em gel de poliacrilamida 10% (p/v) contendo 0,5% de gelatina. Após a corrida, o gel foi incubado *overnight* em tampão enzimático (Tris-HCl, CaCl₂ e ZnCl₂) a 37 °C,

e posteriormente corado com solução de *blue silver* por 14 h, sendo lavado em água Milli-Q para visualização das bandas correspondentes a atividade gelatinolítica das metaloproteinases. As imagens do gel foram digitalizadas utilizando o fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX EX (Loccus, São Paulo, Brasil). Os zimogramas foram analisados por densitometria, através da quantificação das bandas visualizadas usando o software ImageJ.

A concentração de proteínas totais do sobrenadante foi mensurada por meio do método de Bradford.

4.4.2.4 Avaliação da produção de óxido nítrico - reação de Griess

Os níveis de óxido nítrico após o tratamento de células HRT-18 com o extrato E-14 foram determinados por meio da reação de Griess (GIOVANONNI et al, 1997).

Para isso, células HRT-18 foram semeadas em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB na densidade de $6,4 \times 10^3$ células/cm² e incubadas em estufa pelo período de 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com o E-14 na concentração de 16 µg/mL por 72 h. Células do controle negativo foram tratadas com o veículo (DMSO 0,04%) utilizado para diluição do extrato pelo mesmo período de tempo. Uma vez finalizado o tratamento, retirou-se o meio de cultura (sobrenadante) dos poços, o qual foi armazenado em freezer a -80 °C até o momento de realização do ensaio.

Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 100 µL do sobrenadante de cultura celular (referentes aos poços tratados com E-14 e controle negativo). Para o branco, foram pipetados nos poços 100 µL do meio de cultivo (RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB). Em seguida, 100 µL do reagente de Griess, composto por uma mistura de sulfanilamida 1% (diluída em H₃PO₄ 5%) e α-naftil etilenodiamina 0,1% (diluída em água) (1:1) foi adicionado em cada poço. Finalmente, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 550 nm.

A análise de dados foi realizada com base nos resultados de absorvância de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂).

Para correlacionar os níveis de ON detectados no sobrenadante de células tratadas com E-14 e/ou veículo de diluição do extrato ao fluxo intracelular (produção) desse mediador, bem como aos possíveis processos celulares e vias de transdução

de sinal moduladas pelo mesmo e que estariam sendo afetados pelos tratamentos, utilizou-se a classificação de níveis intracelulares de ON proposta por Somasundaram e colaboradores (2019) (Figura 7).

FIGURA 7 – EFEITOS DO FLUXO DE ÓXIDO NÍTRICO NA SINALIZAÇÃO TUMORAL.

Exógeno		Intracelular				
DETA/ON	SPER/ON	Fluxo de ON				
		> 1 μ M				Nível IV
			Dose terapêutica/indução de necrose			
1 mM	~200 μ M	1000 nM	p53	P53-P _{ser 15}	Bloqueio do ciclo celular, indução de apoptose, bloqueio da glicólise	Nível III
300 μ M	50 μ M	300 nM		CD44 P-caderina COX2 IL8, IL6	Stemness metástase	
			HIF1 α			Nível II
100 μ M	25 μ M	100 nM		PI3K/Akt ERK	Proliferação e sobrevivência celular, angiogênese, efeito de Warburg, anabolismo elevado	
50 μ M	10 μ M	50 nM				
						Nível I
25 μ M	10 μ M	10 nM	GCs	GMPc	Papel dúbio – efeito pró ou antitumoral dependendo do contexto	

FONTE: Adaptado de Somasundaram et al. (2019).

NOTA: Níveis intracelulares moderados de ON estimulam a progressão e o desenvolvimento tumoral, enquanto altos níveis de ON induzem efeito antineoplásico. Níveis intracelulares baixos de ON podem mediar efeito pró ou antitumoral, dependendo do contexto. DETA/ON e SPER/ON são doadores espontâneos de óxido nítrico. A figura mostra o fluxo intracelular aproximado de ON e a liberação aproximada de ON do SPER/ON quando comparado com as concentrações indicadas de DETA/ON.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP). Para avaliar a ocorrência de diferença estatística entre os tratamentos foi realizado teste t de Student. Os resultados foram considerados significativos com valores de $p < 0,001$, $p < 0,01$ e/ou $p < 0,05$ conforme aplicado. As análises foram realizadas com o uso do software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.1.1 Avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo

5.1.1.1 Redução da resazurina (Alamar Blue®)

Os resultados obtidos através da execução do ensaio de redução da resazurina, estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 – VALORES DE Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) OBTIDOS APÓS O TRATAMENTO DE CÉLULAS HRT-18 E MCCOY COM OS 19 EXTRATOS DE *L. pacari* (1 – 50 mg/mL) OU 5-FLUOROURACIL (0,125 – 8 nM) PELO PERÍODO DE 72 HORAS.

Extrato/ composto	Líquido extrator	Proporção (v/v)	McCoy		HRT-18	
			Cl_{50}		Cl_{50}	IS
1	água	100	24,26 \pm 1,89		19,88 \pm 2,33	1,2
2	metanol : etanol	50 : 50	28,06 \pm 2,64		18,94 \pm 2,01	1,5
3	metanol : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	26,02 \pm 1,96		24,61 \pm 0,59	1,1
4	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 62,5 : 12,5 : 12,5	24,91 \pm 2,01		22,76 \pm 2,25	1,1
5	metanol	100	24,95 \pm 1,24		18,94 \pm 2,20	1,3
6	água : metanol	50 : 50	24,93 \pm 1,19		16,54 \pm 1,85	1,5
7	água : acetona	50 : 50	28,70 \pm 1,86		18,17 \pm 0,35	1,6
8	água : metanol : acetona : etanol	62,5 : 12,5 : 12,5 : 12,5	27,53 \pm 1,27		20,53 \pm 0,63	1,3
9	água : etanol	50 : 50	29,61 \pm 2,13		20,41 \pm 1,27	1,5
10	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 62,5 : 12,5	22,04 \pm 1,44		15,14 \pm 0,75	1,5
11	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 12,5 : 62,5	23,25 \pm 2,78		15,59 \pm 1,32	1,5
12	etanol	100	19,36 \pm 2,06		18,53 \pm 0,57	1,0
13	água : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	23,10 \pm 2,11		15,59 \pm 1,73	1,5
14	água : metanol : acetona : etanol	25 : 25 : 25 : 25	27,47 \pm 1,43		16,04 \pm 1,03	1,7
15	água : etanol	50 : 50	21,47 \pm 2,57		17,31 \pm 1,85	1,2
16	acetona	100	21,19 \pm 2,75		21,45 \pm 0,93	1,0
17	água : metanol : acetona	33,33 : 33,33 : 33,33	14,88 \pm 2,57		20,28 \pm 1,75	0,7
18	água : metanol : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	29,93 \pm 2,41		32,43 \pm 1,57	0,9
19	metanol : acetona	50 : 50	17,99 \pm 1,97		23,02 \pm 0,71	0,8
5- fluorouracil	-	-	3,13 \pm 0,75		8,82 \pm 1,39	2,8

FONTE: O autor (2020).

A análise da Tabela 8 permite observar que, dos 19 extratos testados, a grande maioria apresentou toxicidade significativa em células HRT-18, sendo os extratos mais citotóxicos e/ou antiproliferativos os de número 10, 11 e 13. Já o extrato menos efetivo foi o número 18, o qual apresentou o valor mais elevado de CI_{50} ($32,43 \pm 1,57 \mu\text{g/mL}$). O 5-fluorouracil, um dos quimioterápicos mais utilizados na clínica para o tratamento de câncer colorretal, exerceu efeito citotóxico/antiproliferativo proeminente ($32,43 \pm 1,57 \mu\text{g/mL}$).

Em relação a linhagem McCoy, a Tabela 8 mostra que, com exceção dos extratos 16, 17, 18 e 19, todas as amostras avaliadas exerceram menor toxicidade neste tipo celular, quando comparado aos efeitos induzidos em células HRT-18. Os extratos que apresentaram menor toxicidade nos fibroblastos murinos foram os de número 7, 9 e 18. Enquanto os mais tóxicos foram os extratos 12, 17 e 19. Por fim, cabe ressaltar que o quimioterápico 5-fluorouracil também exerceu efeito citotóxico/antiproliferativo inferior na linhagem normal quando comparado ao efeito induzido nas células malignas.

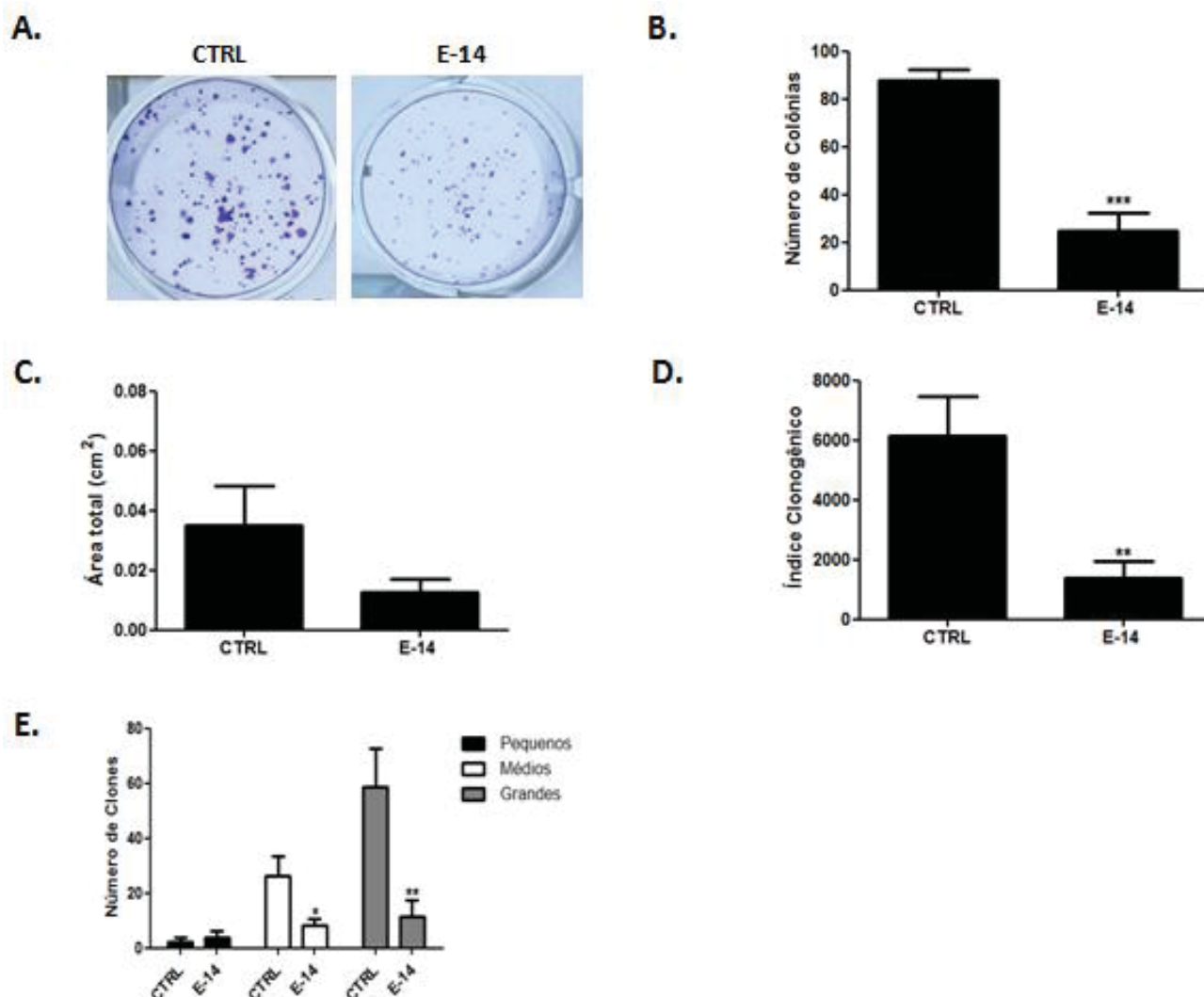
Ainda, pode-se observar que a maioria dos extratos apresentou efeito seletivo no modelo experimental utilizado, sendo o extrato 14 o mais seletivo, com IS de 1,7. Já os extratos 12, 16, 17, 18 e 19 não apresentaram seletividade para as células HRT-18. Como era esperado, o 5-fluorouracil exerceu atividade citotóxica/antiproliferativa seletiva significativa (Tabela 8).

Embora os extratos 10, 11 e 13 tenham promovido significativa toxicidade em células HRT-18, apresentaram um IS inferior ao demonstrado pelo extrato 14 (IS = 1,7), este por sua vez, além de ser o mais seletivo, exerceu efeito citotóxico/antiproliferativo (CI_{50} de $16,04 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$) comparável ao apresentado pelos extratos 10, 11 e 13 (CI_{50} de $15,14 \pm 0,75$, $15,59 \pm 1,32$ e $15,59 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) sendo considerado então o extrato mais promissor dos 19 testados, e sendo selecionado para dar continuidade ao estudo.

5.2.2 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Os resultados referentes a execução do ensaio de formação de colônias estão apresentados na Figura 8.

FIGURA 8 – EFEITO ANTICLONOGÊNICO DO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 72 h com extrato E-14 em concentrações referentes à CI_{50} obtida pelo método de redução da resazurina. Fotografia representativa dos poços após a execução do ensaio (A). Alterações induzidas por E-14 no número de colônias (B) e na área total ocupada pelas colônias no poço (C). Representação dos efeitos induzidos por E-14 pela determinação do índice clonogênico (D). Determinação da indução de efeito citotóxico e/ou antiproliferativo pela estratificação das colônias de acordo com o seu tamanho (E). (***) e (**) denotam diferença estatística de $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

Os resultados obtidos demonstraram que o extrato E-14 reduziu o número de colônias e o índice clonogênico em 72 e 78%, respectivamente (Figura 8 B-D), evidenciando que o extrato exerceu efeito citotóxico e/ou antiproliferativo significativo quando aplicado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ e que este efeito foi persistente, perdurando após a retirada do tratamento.

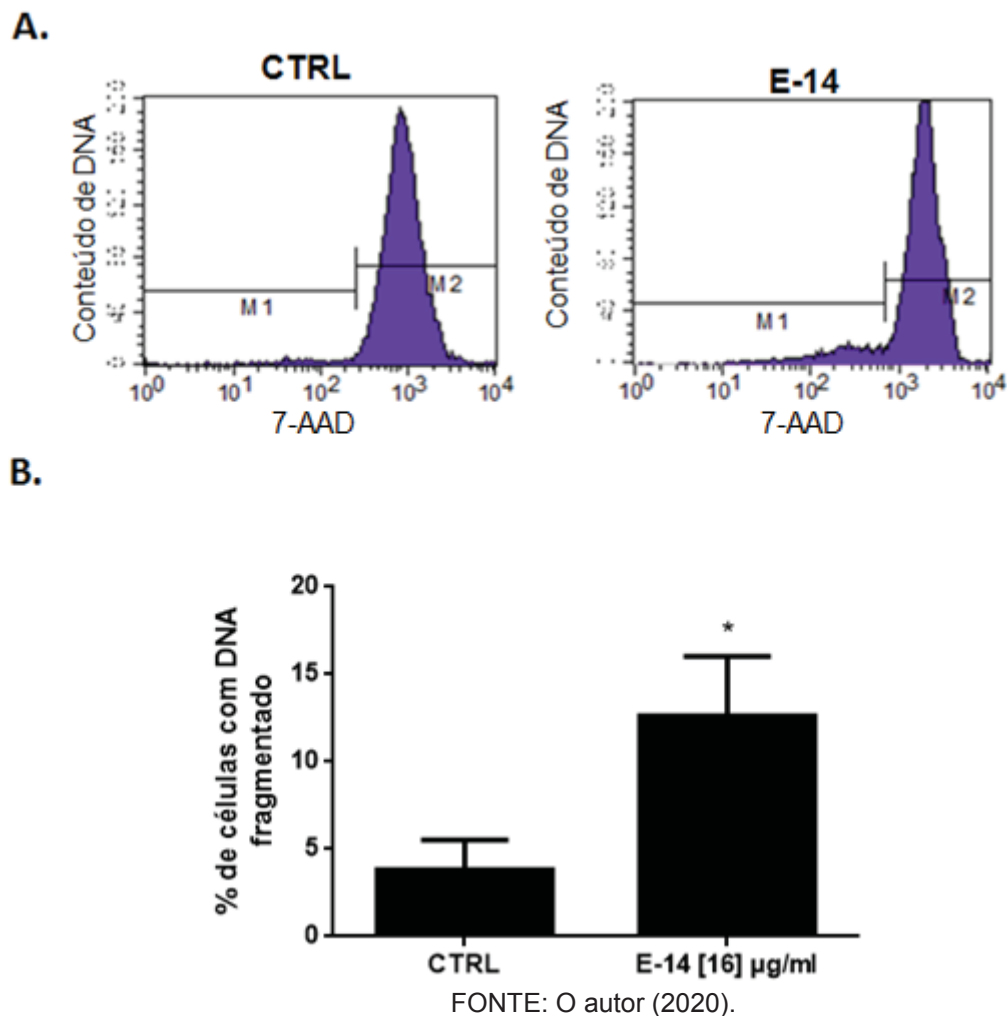
Além disso, o extrato foi capaz de reduzir significativamente, o número de clones médios e grandes, não sendo observado elevação do número de clones (Figura 8 E). A redução do número de colônias, independentemente de seu tamanho, caracteriza a indução de efeito citotóxico, a partir do momento que demonstra a ocorrência do descolamento das células plaqueadas pela ação do tratamento.

Logo, quando analisados em conjunto, os resultados obtidos mostram que E-14 na concentração de 16 µg/mL foi capaz de induzir citotoxicidade relevante de maneira persistente e seletiva em células HRT-18.

5.2.3 Avaliação da fragmentação do DNA

Os resultados referentes a avaliação da fragmentação do DNA induzida por E-14 estão apresentados na Figura 9.

FIGURA 9 – FRAGMENTAÇÃO DO DNA INDUZIDA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



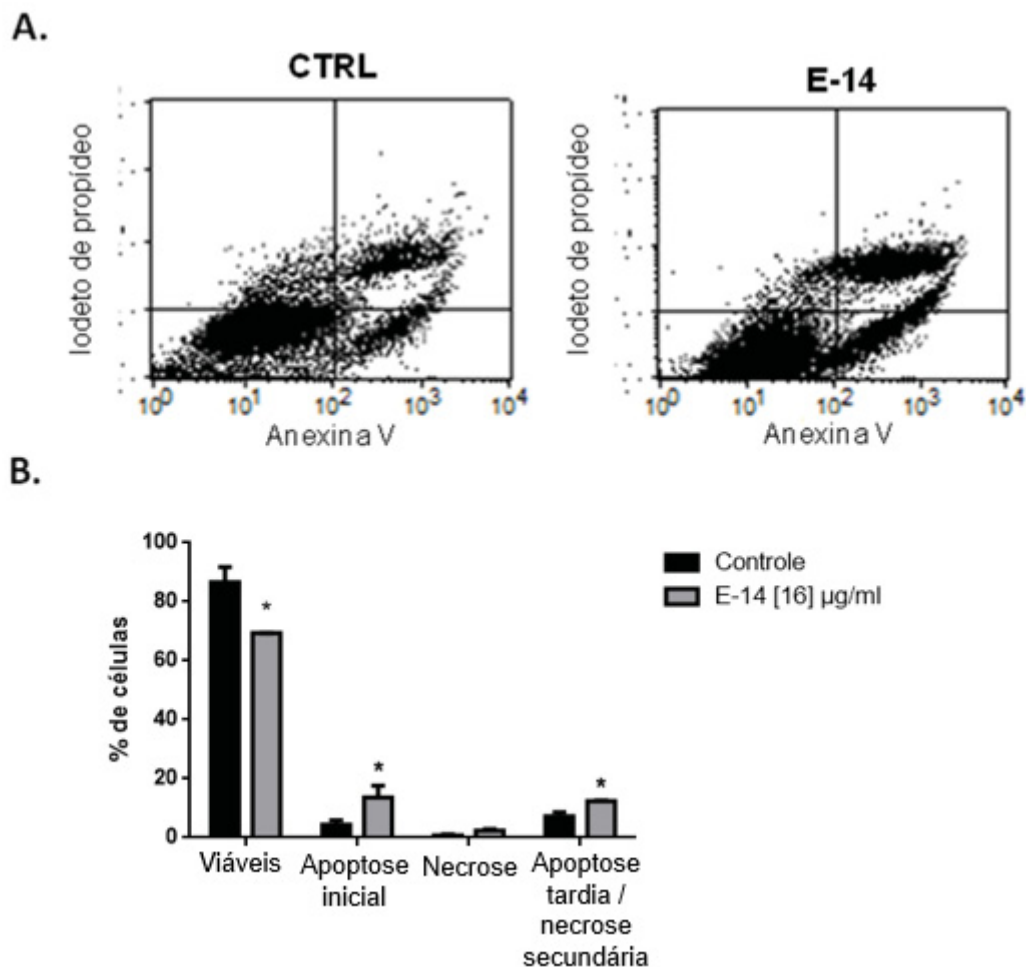
NOTA: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 72 h com extrato E-14 na concentração de 16 µg/mL. Imagens representativas da análise por citometria de fluxo para avaliação da fragmentação do DNA (**A**). Análise quantitativa da fragmentação do DNA (**B**). (*) denota diferença estatística de $p < 0,05$ em relação ao controle (CTRL).

Pode-se observar que o tratamento de células HRT-18 com o extrato 14 (16 µg/mL) por 72 h, foi capaz de elevar em torno de 9% o percentual de células com DNA fragmentado, confirmando a ação citotóxica do extrato.

5.2.4 Determinação do tipo de morte celular induzida

Os resultados obtidos em relação a execução do ensaio de exposição da fosfatidilserina concomitantemente a incorporação do iodeto de propídeo estão apresentados na Figura 10.

FIGURA 10 – ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA DO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



FONTE: O autor (2020).

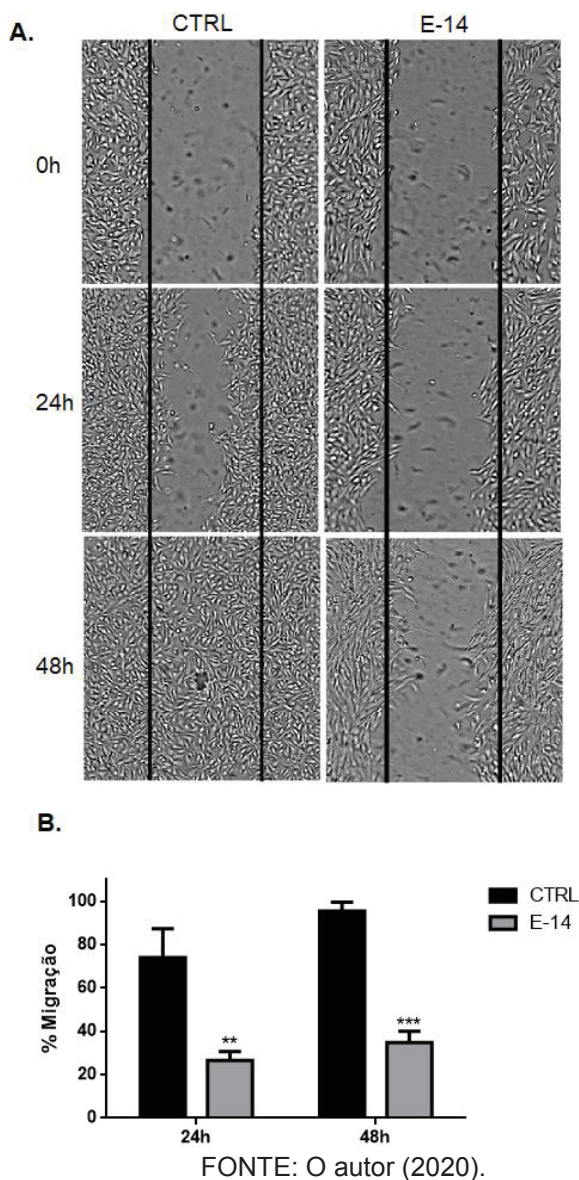
NOTA: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 72 h com extrato E-14 na concentração de 16 µg/mL. Imagens representativas da análise por citometria de fluxo para avaliação do tipo de morte celular induzido **(A)**. Análise quantitativa das populações presentes nos quatro quadrantes **(B)**. (*) denota diferença estatística de $p < 0,05$ em relação ao controle (CTRL).

A Figura 10, mostra que o tratamento com o extrato E-14, na concentração de 16 µg/mL, foi capaz de elevar em torno de 9 e de 5%, respectivamente, o percentual de células em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose secundária. Não foi observada alteração significativa no percentual de células em necrose primária. A via, bem como os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não foram devidamente identificados.

5.2.5 Avaliação da migração celular

Os resultados referentes aos efeitos promovidos pelo extrato E-14 na capacidade migratória de células HRT-18 estão demonstrados na Figura 11.

FIGURA 11 – INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR PROMOVIDA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



Nota: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 72 h com extrato E-14 na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$. Fotos capturadas nos tempos 0, 24 e 48 h após o tratamento com E-14 (A). Análise quantitativa do ensaio de migração (B). (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

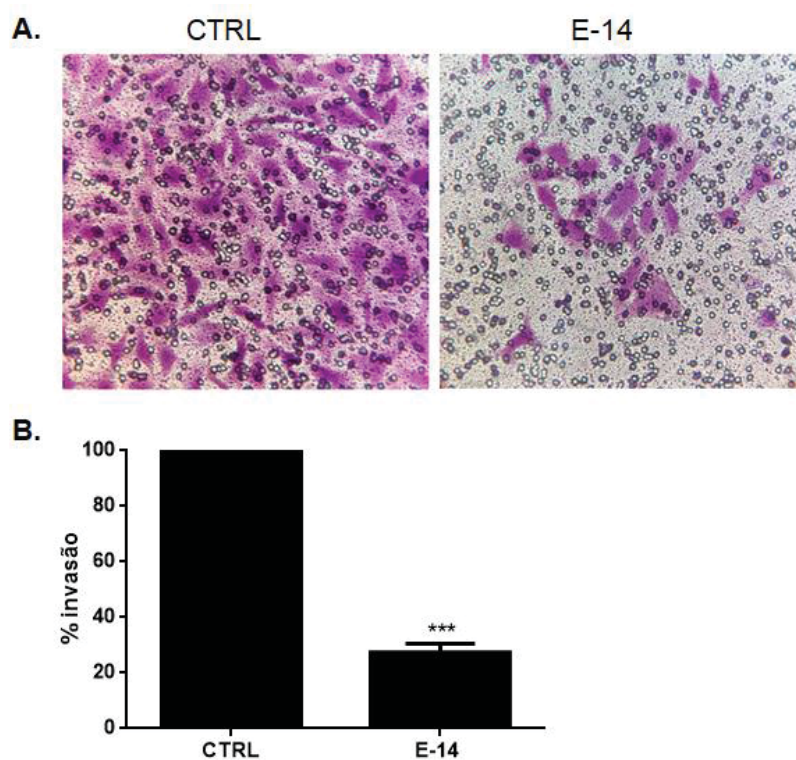
A Figura 11 mostra que o tratamento das células HRT-18 com o extrato E-14 foi capaz de inibir a migração celular em 64% após a exposição ao extrato pelo período

de 24 e 48 h. Ainda, não foram observadas alterações morfológicas e/ou citotoxicidade induzida por E-14 na concentração utilizada (dados não mostrados). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não foram devidamente identificados.

5.2.6 Avaliação do potencial invasivo

Os dados referentes a influência do extrato E-14 sobre a capacidade invasiva de células HRT-18 foi demonstrado na Figura 12.

FIGURA 12 – INIBIÇÃO DA INVASÃO CELULAR MEDIADA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



FONTE: O autor (2020).

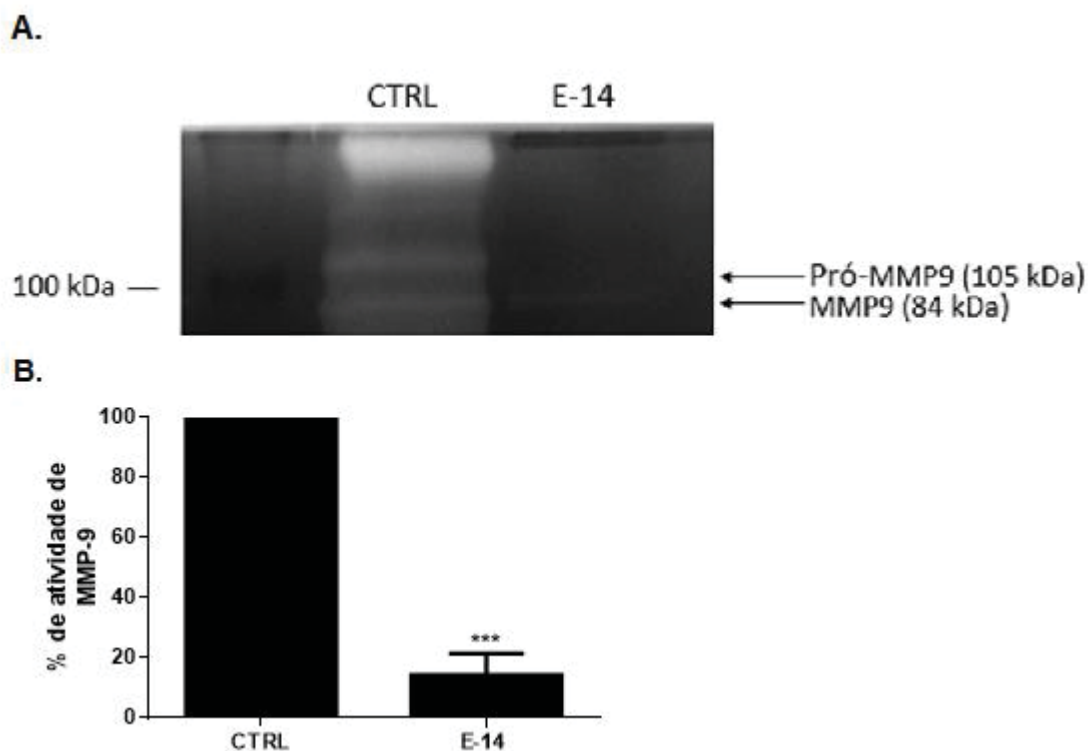
NOTA: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 72 h com E-14 na concentração de 16 µg/mL. Fotos capturadas após 48 horas de tratamento com E-14 (A). Análise quantitativa do ensaio de invasão (B). (***) denota diferença estatística de $p < 0,001$, em relação ao controle (CTRL).

Pode-se observar que células HRT-18 tratadas com o extrato 14 (16 µg/mL) pelo período de 48 h, apresentaram uma redução de 73% de sua capacidade invasiva em comparação ao controle, sugerindo que tal extrato pode minimizar a ocorrência de metástase ao interferir na invasão celular.

5.2.7 Avaliação da atividade de metaloproteinases

Os dados referentes a influência do extrato E-14 sobre a inibição da metaloproteinase foi demonstrado na Figura 13.

FIGURA 13 – INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PRÓ-MMP-9 E MMP-9 MEDIADA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



FONTE: O autor (2020).

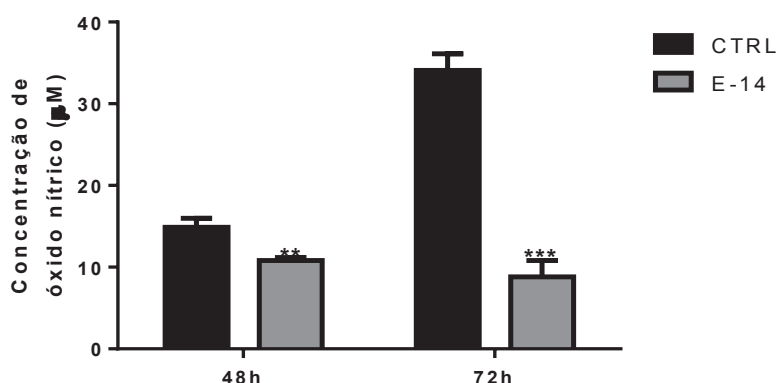
NOTA: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 48 h com E-14 na concentração de 16 µg/mL. Zimograma mostrando atividade gelatinolítica da pró-MMP-9 e MMP-9 (**A**). Quantificação por densitometria expressam porcentagem de atividade de MMP-9 e pró-MMP-9 em comparação ao controle (**B**). (***) denota diferença estatística de $p < 0,001$ em relação ao controle (CTRL).

A Figura 13 mostra que o tratamento com E-14 (16 µg/mL) por 48 h foi capaz de bloquear a atividade das formas latentes de MMP-9. Ainda E-14 reduziu em 86% a atividade de MMP-9 ativa. Os dados obtidos sugerem que E-14 pode estar reduzindo os níveis e/ou a transcrição de metaloproteinases gelatinolíticas.

5.2.8 Avaliação da produção de óxido nítrico

Os resultados referentes ao efeito do extrato E-14 sobre a produção de óxido nítrico por células HRT-18 foi demonstrado na Figura 14.

FIGURA 14 – REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIADA PELO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Células HRT-18 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 48 e 72 h com E-14 na concentração de 16 µg/mL. (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

Utilizando a classificação proposta por Somasundaram e colaboradores (2019), e comparando os resultados obtidos aos níveis extracelulares correspondentes aos induzidos pelo doador espontâneo de óxido nítrico SPER/ON, percebe-se que células HRT-18 tratadas com o veículo de diluição do extrato pelo período de 48 h apresentaram uma produção de ON (em torno de 15 µM) encontrada entre os níveis I e II, sendo o fluxo intracelular de ON correspondente à faixa de 50 a 100 nM, mostrando o início da modulação de vias relacionadas a sobrevivência, proliferação e malignização por parte do controle negativo (CTRL). O tratamento de células HRT-18 com E-14 por 48 h, reduziu significativamente a produção de óxido nítrico pelas células tumorais (em torno de 27%), fazendo com que as mesmas apresentassem um fluxo intracelular de ON entre 10-50 nM correspondente ao nível I.

Células HRT-18 tratadas com o veículo de diluição do extrato pelo período de 72 h, e referentes ao CTRL, apresentaram uma produção de ON (em torno de 34 µM) que corresponde a um fluxo intracelular de ON entre 100 e 300 nM, categorizado como nível II, e associado à proliferação e sobrevivência das células tumorais, bem como a estímulos para ocorrência de metástase e angiogênese. Ainda, células HRT-18 tratadas com E-14 pelo período de 72 h foram capazes de reduzir a produção e o fluxo intracelular de ON (em torno de 74%) fazendo com que o mesmo retornasse para o nível I.

6 DISCUSSÃO

De maneira geral, o potencial de um determinado composto e/ou produto natural do qual suspeita-se possuir atividade antitumoral é avaliado preliminarmente, através da execução de ensaios de citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*, os quais verificam a capacidade destes compostos e/ou produtos em causarem interferências no processo de adesão celular, na atividade metabólica e na manutenção da integridade da membrana das células cultivadas (WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005; SCHILLING; GESERICK; LEVERKUS, 2014). Quando estes ensaios são realizados com o intuito de caracterizar o potencial antitumoral de um composto e/ou produto natural, o esperado é que o composto e/ou produto teste seja capaz de inibir a proliferação e/ou promover a morte de células tumorais cultivadas *in vitro* (FELIPE, 2010).

Desta forma, com o objetivo de avaliar o potencial antitumoral e selecionar os extratos de *L. pacari* mais promissores, o presente estudo iniciou-se com a execução do ensaio da redução da resazurina, também conhecido como Alamar Blue®. Tal ensaio avalia a atividade mitocondrial, ou seja, possíveis interferências causadas por um composto e/ou extrato no metabolismo celular. Através deste teste, pode-se estabelecer a citotoxicidade e/ou atividade antiproliferativa dos diferentes extratos, à medida que células metabolicamente ativas reduzem o corante resazurina (cor azul e baixa fluorescência) em resofurina (cor pink e alta fluorescência) (NOCIARI et al., 1998; BORRA et al. 2009).

Uma das grandes vantagens do Alamar Blue® sobre o método do MTT, um ensaio que também avalia a capacidade citotóxica e/ou antiproliferativa por meio da mensuração da atividade mitocondrial, é de que a resofurina, diferentemente do formazan, é solúvel em meio de cultura, não necessitando a adição de solventes orgânicos para sua solubilização (RISS et al., 2016).

O Programa de Triagem de Plantas do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, considera que um extrato bruto apresenta potencial citotóxico sobre células tumorais quando se obtém um valor de CI_{50} menor que 20 $\mu\text{g/mL}$ após a exposição das células ao extrato teste por um período de 48 a 72 h (MAHAVORASIRIKUL et al., 2010). Dessa forma, o *screening* realizado demonstrou que, dos 19 extratos avaliados, apenas 8 (3, 4, 8, 9, 16, 17, 18 e 19) não apresentaram toxicidade significativa em células HRT-18, sugerindo que a *L. pacari* trata-se de uma

espécie vegetal promissora no tratamento do câncer colorretal, e que deve ser melhor investigada quanto ao seu potencial antitumoral (Tabela 8).

A atividade citotóxica e antiproliferativa de *L. pacari* já vem sendo estudada, inclusive por nosso grupo de pesquisa, tendo sido evidenciada tais ações em diferentes tipos celulares, como células de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), células leucêmicas (U-937, Daudi e Jurkat), células de câncer cervical (HeLa), neuroblastomas (SH-SY5Y) e células de câncer colorretal (HRT-18) (MARCONDES, et al., 2014; REICHERT et al., 2018; ATHERINO, 2019). Entretanto, grande parte destes estudos apenas caracterizaram a indução do efeito citotóxico/antiproliferativo dos extratos e frações de *L. pacari*, evidenciando a importância do presente trabalho no que concerne a elucidação de mecanismos envolvidos na mediação destes efeitos.

Como mencionado anteriormente, os maiores problemas relacionados à quimioterapia, referem-se à incidência de efeitos adversos associados a elevada toxicidade e inespecificidade dos antineoplásicos, bem como a acentuada resistência a vários fármacos (MDR) (JENDIROBA et al., 2002). Portanto, quando considera-se câncer, é de fundamental importância levar em consideração quesitos relacionados a eficácia e segurança na pesquisa de novos fármacos e/ou terapias. Nesse sentido, o efeito citotóxico e/ou antiproliferativo dos 19 extratos de *L. pacari* também foram avaliados em uma linhagem celular normal, mais especificadamente células McCoy, que trata-se de fibroblastos murinos.

Adicionalmente, foi calculado o índice de seletividade (IS) dos 19 extratos testados. Uma vez que o cálculo do índice leva em consideração tanto o valor CI_{50} determinado para as células tumorais, quanto para as células normais, o mesmo é capaz de demonstrar o quanto um composto e/ou extrato afetou a proliferação ou induziu a morte celular em maior ou menor proporção em células neoplásicas em comparação às células normais, sendo capaz de expressar sua seletividade (CALDERÓN-MONTAÑO et al. 2014).

De acordo com Calderón-Montaño e colaboradores (2014), um composto pode ser considerado seletivo a partir do momento que apresenta valores de CI_{50} para célula não-tumoral igual ou inferiores àqueles encontrados para a célula tumoral, levando a um $IS \geq 1$. Nesse sentido, pode-se observar que 16 extratos exerceram efeito citotóxico/antiproliferativo seletivo, destacando-se o extrato E-14, o qual também apresentou toxicidade relevante em células HRT-18 (Tabela 8), sendo

considerado o extrato mais promissor e utilizado para realizar os demais ensaios do trabalho.

Os resultados obtidos corroboram com outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, onde foi demonstrado que extratos de *L. pacari* exerceram efeito citotóxico/antiproliferativo seletivo em células de carcinoma de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e colorretal (HRT-18) (REICHERT et al., 2018; ATHERINO, 2019) em relação a fibroblastos murinos (McCoy). Ainda, Pereira e colaboradores (2018) relataram a ausência de toxicidade do extrato hidroalcoólico produzido a partir de folhas de *L. pacari* sobre células CHO-k1 (células de tecido de ovário de hamster chinês) e L929 (fibroblasto murino), além da administração de doses de até 2000 mg/kg (v.o) do extrato em camundongos e não observaram indução de toxicidade nos animais. Por fim, Cordeiro e colaboradores (2019) observaram significativo efeito citotóxico seletivo do extrato hidroetanólico produzido a partir das cascas do caule de *L. pacari* sobre células de carcinoma pulmonar A549, H2023 e H460 em relação a fibroblastos humanos (BJ).

Dentre os compostos identificados no extrato E-14 possivelmente responsáveis pela indução do efeito citotóxico/antiproliferativo, merece destaque o ácido elágico, bem como os elagitaninos (taninos hidrolisáveis), visto que, estes últimos, são hidrolizados originando o ácido elágico em condições/locais/compartimentos celulares que apresentam pH mais elevado (entre 7,1 a 8,4) (LARROSA et al., 2010; LIPÍŃSKA; KLEWICKA; SÓJKA, 2014). Dados da literatura demonstram que o ácido elágico e os elagitaninos apresentam efeito citotóxico em diversas linhagens tumorais, tais como linhagens de câncer cervical (CaSki, HeLa, SiHa e C33A), câncer colorretal (Caco-2, SW-620, HT-29, HCT-15 e HCT-116), câncer de mama (MCF-7), câncer de próstata (DU-145 e PC-3) e câncer de pulmão (A549) (NARAYANAN et al., 1999; MERTENS-TALCOTT et al., 2006; DIKMEN et al., 2011; VICINANZA et al., 2013; UMESALMA; NAGENDRAPRABHU; SUDHANDIRAN, 2014; DE MOLINA et al., 2015; CHEN et al., 2015; ZHAO et al., 2017; LIU et al., 2018; LI et al., 2018), sendo tal efeito exercido, na maioria das vezes, de maneira seletiva (LOSSO et al., 2004; LARROSSA et al., 2006; WEISBURG et al., 2013) corroborando os resultados obtidos.

É estabelecido na literatura que a absorção intestinal do ácido elágico, bem como dos elagitaninos é bastante lenta, sendo que as moléculas não absorvidas são metabolizadas pela microbiota do cólon e convertidas em urolitina, a qual vêm demonstrando significativo efeito preventivo em diversas doenças crônicas, incluindo

diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ESPÍN, et al., 2013). Além disso, o potencial antitumoral de urolitinas não foi levado em consideração, uma vez que o mesmo foi desenvolvido essencialmente *in vitro* em um sistema envolvendo apenas o cultivo de células tumorais. Acredita-se que as urolitinas possam contribuir imensamente para o efeito antitumoral *in vivo* atribuído ao ácido elágico e aos elagitaninos.

Uma característica comum presente em células durante o processo de morte, refere-se à perda da integridade reprodutiva, a qual acarreta na inabilidade da mesma em proliferar de forma ilimitada. Tal parâmetro é avaliado pelo ensaio clonogênico, uma vez que, através de sua execução, consegue-se determinar o número de células capazes de proliferar e de gerar progenitores após a exposição a um determinado tratamento (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

Diferentemente de ensaios não clonogênicos utilizados para determinação de viabilidade e/ou proliferação celular, os quais avaliam os efeitos de um determinado tratamento a curto prazo, ou seja, seu efeito agudo, o ensaio clonogênico é capaz de mensurar os efeitos promovidos a longo prazo, sendo útil para verificar a reversibilidade total ou parcial dos efeitos induzidos pelo composto teste (SUMANTRAN, 2011). Outra vantagem do ensaio de formação de colônias sobre métodos não clonogênicos, refere-se ao fato de que, através da realização do mesmo, é possível diferenciar a indução de efeito citotóxico do efeito antiproliferativo (PLUMB, 2004), evidenciados através da redução do número e do tamanho (área) das colônias, respectivamente (GUSMÁN et al., 2014).

Uma observação mais detalhada das colônias formadas pela execução do ensaio clonogênico, permitiu identificar a presença de clones de diferentes tamanhos em todos os poços plaqueados (incluindo poços referentes ao controle negativo), os quais foram classificados como clones pequenos, médios e grandes. Tal estratificação demonstra que o crescimento das colônias, bem como a resposta a um determinado tratamento não ocorre de maneira uniforme, evidenciando a presença de clones com sensibilidades diferentes ao mesmo. Logo, a análise do ensaio clonogênico pelo número de colônias ou pela área total ocupada por estas, pode muitas vezes, não representar com exatidão o efeito de um tratamento. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa propôs a criação do índice clonogênico (IC), o qual permite correlacionar o número de colônias ao seu tamanho (área individual), permitindo a expressão dos resultados obtidos de maneira mais adequada, uma vez que leva em consideração as

variáveis analisadas pela determinação do número de colônias e da área ocupada pelas colônias no poço de maneira conjunta, ou seja, leva em consideração a diferença de sensibilidade dos clones ao tratamento empregado (avaliado pela área total), associado a quantidade de clones formados (avaliado pela contagem).

Os resultados obtidos demonstram que o extrato E-14 exerceu significativo efeito anticlonogênico, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente, o número de colônias e o índice clonogênico (Figura 8 B-D). Além disso, o extrato foi capaz de promover a redução do número de clones médios e grandes (Figura 8 E), caracterizando a indução do efeito predominantemente citotóxico, o qual perdurou após a retirada do tratamento.

O potencial anticlonogênico dos extratos de *L. pacari* já foi observado em células MCF-7, MDA-MB-231 e HRT-18, corroborando com os resultados obtidos neste estudo (REICHERT et al., 2018; ATHERINO, 2019). Também tem sido demonstrado que compostos presentes no extrato E-14, tais como elagitânicos (punicalagina e punicalina) e o ácido elágico isolados do suco de romã foram capazes de reduzir a formação de colônias em células HT-29 (KASIMSETTY et al., 2010). Por fim, Duan e colaboradores (2018) verificaram que o ácido elágico foi capaz de reduzir a formação de clones em células de câncer de pulmão (HOP62 e H1975).

Uma vez finalizado o ensaio clonogênico, avaliou-se a capacidade do tratamento com o extrato E-14 (16 µg/mL) em induzir a fragmentação do DNA em células HRT-18, com o intuito de confirmar a citotoxicidade induzida pelo extrato. Tal ensaio foi realizado avaliando-se o conteúdo de DNA celular por citometria de fluxo evidenciado pela utilização do corante vital 7-AAD.

O método baseia-se no fato de que, o corante 7-AAD, ao entrar nas células (devidamente permeabilizada), intercala-se nas bases do DNA. Quando o DNA está íntegro, ocorre maior incorporação do 7-AAD e, conseqüentemente, maior emissão de fluorescência. Quando o DNA está fragmentado, ocorre menor incorporação deste fluoróforo e menor emissão de fluorescência (DATI, 2012).

Embora a fragmentação do DNA seja um evento que ocorre em diversos tipos de morte celular, tais como necrose (COLLINS et al., 1997) e apoptose (TANG et al., 2019), a literatura utiliza a técnica de avaliação da fragmentação do DNA pelo uso de corantes vitais (tais como o iodeto de propídeo) associada à citometria de fluxo, como um ensaio indicativo da ocorrência de morte celular por apoptose (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Os protocolos destinados a este uso baseiam-se no fato de que,

durante a apoptose, a ativação de caspases executoras levam a fragmentação do DNA em fragmentos constituídos por aproximadamente 200 pares de base (COLLINS et al., 1997), o que faz com que células no estágio final da apoptose e que apresentem o DNA degradado apareçam como células hipodiplóides, estando representadas nos chamados picos sub-G1 nos histogramas de DNA. Desta forma, tal população pode ser facilmente distinta das células diplóides, dispostas em um pico estreito localizado à direita do pico sub-G1 (RICCARDI, NICOLETTI, 2006).

Os dados obtidos mostram que o extrato E-14 promoveu importante fragmentação do DNA (Figura 9). Dessa forma, os resultados obtidos e associados aos relatados na literatura, sugerem que a fragmentação do DNA e o efeito citotóxico promovido por E-14 em células HRT-18 pode estar relacionado a indução de apoptose.

Tem sido demonstrado que o ácido elágico é capaz de promover a fragmentação do DNA de diversas linhagens neoplásicas. Vanella e colaboradores (2013) evidenciaram que o ácido elágico foi capaz de promover a fragmentação de células de câncer de próstata (DU-145 e LNCaP) através da realização do ensaio do cometa. Já Umesalma, Nagendrababhu e Sudhandiran (2014) e Narayanan e colaboradores (1999) realizaram uma eletroforese em gel de agarose e verificaram que este composto foi capaz de fragmentar o DNA de células de câncer de cólon (HCT-15) e de carcinoma cervical (CaSki), respectivamente, observando a formação de um perfil de fragmentação escalonado, conhecido como *ladder*, característico do processo apoptótico.

Nowak e colaboradores (2017) relataram que uma mistura de elagitaninos extraídos de *Rubus idaeus* L. foi capaz de promover a quebra da fita dupla do DNA de células Caco-2. Além do mais, foi demonstrado que os elagitaninos 1- α -O-galoilpunicalagina, punicalagina, 2-O-galoilpunicalina e sanguina H-4 isolados de *Terminalia calamansanai* foram capazes de fragmentar o DNA de células HL-60, gerando o perfil escalonado relacionado a indução de apoptose (CHEN et al., 2009).

Para confirmar o envolvimento da apoptose na citotoxicidade induzida por E-14, avaliou-se, através de citometria de fluxo, a exposição da fosfatidilserina (captada por sua ligação à anexina V) e a incorporação do iodeto de propídeo através da exposição das células HRT-18 ao extrato.

Os estágios iniciais da apoptose são caracterizados por alterações na membrana celular, ocorrendo a exposição da fosfatidilserina (PS), um fosfolípido

carregado negativamente e que se encontra no interior da bicamada lipídica, para a superfície celular. A anexina V trata-se de uma proteína dependente de cálcio que se liga a fosfolipídeos, possuindo uma alta afinidade pela PS. Dessa forma, a anexina V, quando associada a fluorocromos, tais como o FITC ou Alexa fluor, pode ser utilizada como uma sonda para detectar a exposição da fosfatidilserina através da citometria de fluxo (VERMES et al., 1995).

A exposição da PS na superfície celular não é um evento exclusivo do processo apoptótico podendo ocorrer também durante a necrose. A diferença entre esses dois tipos de morte celular, é que nas etapas iniciais da apoptose, apesar de ocorrer a translocação da PS para a superfície da célula, a membrana plasmática permanece intacta, enquanto que, durante o processo necrótico ocorre a perda da integridade da membrana, permitindo a entrada de moléculas de grande tamanho, como os corantes vitais iodeto de propídeo (PI) e 7-AAD que podem marcar as células necróticas (VERMES et al., 1995).

Assim, a marcação de células com anexina V-FITC concomitantemente com a utilização de corantes vitais fluorescentes (como o PI) permite distinguir células viáveis (FITC - e PI -), em apoptose inicial (FITC + e PI -), em necrose primária (FITC - e PI +) e em apoptose tardia/necrose secundária (FITC + e PI +).

Como mencionado anteriormente, o tratamento de células HRT-18 com o extrato E-14 (16 µg/mL) foi capaz de promover a fragmentação do DNA em pequenos fragmentos, evidenciados pela presença de células hipodiplóicas (Figura 9). Tais resultados associados ao apresentado na Figura 10, sugerem que o tipo de morte induzida pelo tratamento de células HRT-18 com E-14 trata-se de apoptose, sendo a população celular presente no quadrante superior direito, considerada em apoptose tardia e não em necrose secundária. Experimentos estão sendo conduzidos para avaliar marcadores de apoptose, tais como o p53, a fim de confirmar o envolvimento do processo apoptótico como o tipo de morte celular predominante na indução de efeito citotóxico mediado por E-14 em células HRT-18.

Até o presente momento, existem dois estudos que demonstraram o efeito apoptótico de extratos de *L. pacari* sobre células tumorais. Marcondes e colaboradores relataram que o extrato metanólico obtido das cascas de *L. pacari* foi capaz de induzir a apoptose em células leucêmicas U-937, células de câncer cervical (HeLa), neuroblastomas (SH-SY5Y) e células de câncer colorretal (HRT-18). Cordeiro e colaboradores (2019) verificaram que o extrato etanólico obtido das cascas de *L.*

pacari foi capaz de elevar significativamente o percentual de células na fase sub-G1 do ciclo celular, bem como ativar a caspase-3 em células de carcinoma pulmonar (H460), demonstrando o envolvimento da apoptose na citotoxicidade induzida pelo extrato.

Além disso, é amplamente demonstrado na literatura que o ácido elágico, bem como os elagitaninos são capazes de desencadear a apoptose em diversas células neoplásicas, incluindo células leucêmicas (HL-60 e K562), glioblastoma (U-251 MG), células de câncer ovariano (ES-2 e PA-1), carcinoma pulmonar (A549) e carcinoma hepático (HepG2) (LIU et al., 2004; CHEN et al., 2009; CHUNG et al., 2013; WANG et al., 2016; TODA et al., 2019, LI et al., 2019).

Em relação a via da apoptose que é desencadeada pela ação do ácido elágico e elagitaninos, a maior parte dos trabalhos relatam a ativação da via mitocondrial. Umesalma, Nagendraprabhu e Sudhandiran (2014) demonstraram que o ácido elágico foi capaz de desencadear a via intrínseca da apoptose em células de adenocarcinoma de cólon (HCT-15) ao elevar os níveis de Bax e do citocromo c, bem como ao reduzir os níveis de Bcl-2. Larrosa e colaboradores (2006) verificaram que o ácido elágico foi capaz de induzir a ocorrência da via mitocondrial em células Caco-2 ao reduzir a expressão de Bcl-XL, promover a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol, bem como ativar as caspases-9 e 3. Ainda, foi observado que o ácido elágico promove a ativação da via intrínseca em células de câncer colorretal (HCT-116) através da elevação dos níveis de Bad e redução dos níveis de Bcl-XL (ZHAO et al., 2017).

Cho e colaboradores (2015) relataram que os elagitaninos extraídos das sementes da framboesa preta (*Rubus occidentalis* L.) foram capazes de induzir a apoptose em células HT-19 através do desencadeamento da via intrínseca e extrínseca, uma vez que os mesmos elevaram a atividade das caspases-8 e 9.

A atividade pró-apoptótica do ácido elágico também foi evidenciada em modelos experimentais *in vivo*. Shabana e colaboradores (2018) demonstraram que o ácido elágico quando administrado oralmente na dose de 50 mg/kg aumentou a sobrevivência dos animais e reduziu o volume de células compactadas em camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Ainda, foi relatado que este composto induziu a apoptose de células do TAE através do desencadeamento da via intrínseca ao aumentar a expressão de Bax e reduzir os níveis de Bcl-2 (SHABANA et al., 2018). Em modelo de câncer de cólon induzido pela administração de 1,2

dimetilhidrazina, foi demonstrado que o ácido elágico, quando administrado via oral na dose de 60 mg/kg, ativou a via intrínseca da apoptose em células transformadas, ao elevar os níveis de Bax e permitir o extravasamento do citocromo c para o citosol (UMESALMA; SUDHANDIRANL, 2011), corroborando com os resultados obtidos. Por fim, cabe ressaltar que experimentos estão sendo realizados a fim de determinar o envolvimento da via intrínseca e/ou extrínseca da apoptose na ação citotóxica do extrato E-14.

A presença de metástase é considerada como a principal causa de morbimortalidade em pacientes com câncer. Diante disso, compostos e/ou tratamentos que apresentam atividade anti-metastática demonstram ser importantes ferramentas para a melhora do prognóstico e do aumento do tempo de sobrevida dos pacientes (DUFFY, 1996).

Tem sido demonstrado que a metástase relacionada ao câncer colorretal envolve a ocorrência da transição epitélio-mesenquimal (EMT), evento que é essencial para que as células percam características epiteliais e adquiram características mesenquimais, favorecendo a progressão de tumores malignos (MENG et al., 2019).

Desta forma, neste estudo, o potencial anti-metastático de *L. pacari* foi avaliado através da execução de ensaios *in vitro* que investigaram a influência do extrato E-14 na migração e invasão celular.

A inibição da migração celular promovida pelo tratamento de células HRT-18 com E-14 foi avaliada pelo ensaio de *wound healing*. Este método é baseado na capacidade das células migrarem para uma fenda (área sem células) criada em uma monocamada celular até o preenchimento total do espaço, mimetizando o comportamento das células durante a migração *in vivo* (BÜRK, 1973). Este ensaio possibilita a investigação do efeito de compostos capazes de interferir no processo de migração celular e avaliar as interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), as quais participam ativamente da regulação deste mecanismo (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2005).

O efeito do extrato E-14 de *L. pacari* sobre a capacidade invasiva das células tumorais foi avaliado utilizando um sistema *transwell*, cujos poros da membrana foram bloqueados adicionando-se matrigel, visando mimetizar a matriz extracelular típica encontrada pelas células tumorais durante o processo de invasão (MARSHALL, 2011).

Os resultados obtidos demonstraram que E-14 (16 µg/mL) reduziu significativamente a migração e a invasão de células HRT-18 (Figura 11 e 12), sugerindo um importante efeito anti-metastático para a espécie vegetal, o qual foi evidenciado pela primeira vez no presente estudo.

Até o presente momento, o único relato existente na literatura acerca da realização do ensaio do *wound healing* para verificar o efeito de *L. pacari* na migração celular trata-se de um estudo realizado por Pereira e colaboradores (2018). Nesse estudo, os autores verificaram que o extrato hidroalcoólico de *L. pacari*, quando administrado em concentrações não tóxicas (0,01 - 0,5 µg/mL), favoreceram a migração/proliferação de fibroblastos murinos (L929) ao estimular a via das MAPKs, evidenciando o potencial cicatrizante da espécie vegetal. Entretanto, cabe ressaltar que os resultados obtidos no estudo supracitado não invalidam os apresentados neste trabalho, uma vez que o procedimento adotado para realização do ensaio de *wound healing* por Pereira e colaboradores (2018) não envolveu a redução do estímulo da proliferação (normalmente realizada pela diminuição da concentração de SFB), visto que a intenção destes autores era avaliar o efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico.

A capacidade do ácido elágico em inibir a migração e a invasão de células tumorais vem sendo extensivamente descrito na literatura. Tem sido demonstrado que este polifenol é capaz de reduzir a migração de células de osteosarcoma (Saos2 e MG63), carcinoma endometrial (KLE e AN3CA), carcinoma de próstata (PC-3) e células de carcinoma pancreático (PANC-1) (PITCHAKARN et al., 2013; CHENG et al., 2017; XU et al., 2018; WANG et al., 2019).

Pajari e colaboradores (2016) relataram que o extrato metanólico de *Rubus chamaemorus*, rico em elagitaninos, foi capaz de inibir a migração de células de adenocarcinoma de cólon (HT29 e HCA7), bem como de reduzir o número e o tamanho de adenocarcinomas em camundongos C57BL/6J-ApcMin/J.

É bem estabelecido que as metaloproteinases ao promoverem a degradação de proteínas da matriz extracelular, bem como modificarem integrinas, moléculas de adesão e de promoverem a ativação de citocinas como o fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) contribuem para a ocorrência da EMT, favorecendo a migração, invasão e metástase (Xu et al., 2009). Uma vez que E-14 reduziu significativamente a migração e a invasão de células HRT-18, achou-se pertinente

avaliar se tais efeitos estariam vinculados a interferências na atividade de metaloproteinases, o que foi verificado através da realização da técnica de zimografia.

A zimografia é um método qualitativo simples e sensível baseado na eletroforese SDS-PAGE de géis copolimerizados com um substrato de proteína, tais como gelatina, caseína e colágeno. A gelatina é usada como substrato protéico para avaliar a atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9, enquanto a caseína é utilizada para avaliar a atividade de MMP-3, MMP-7 e MMP-10 e o colágeno é usado para avaliar a atividade da MMP-16. A zimografia permite identificar MMPs em sua forma ativa e latente, tendo como base seu peso molecular. Tal método pode ser executado em diversas amostras incluindo misturas complexas como meio de células cultivadas, meio condicionado, bem como líquidos ou preparações purificadas (LISBOA; ANDRADE; CUNHA-MELO, 2013). Nesse estudo, a técnica de zimografia foi realizada utilizando um gel copolimerizado com gelatina. Os resultados obtidos demonstraram que E-14 (16 µg/mL) foi capaz de reduzir, de maneira significativa, a atividade da MMP-9 ativa, bem como de bloquear a atividade de pró-MMP-9 (Figura 13).

A MMP-9 é uma enzima proteolítica chave no remodelamento da matriz extracelular relacionado à metástase do câncer colorretal. Além disso, tal metaloproteinase é capaz de elevar as concentrações de VEGF no microambiente tumoral favorecendo a angiogênese. Diversos estudos têm relatado a elevação dos níveis de MMP-9 no tecido e no plasma de pacientes com câncer colorretal, sugerindo que a determinação dos níveis desta metaloproteinase possa ser utilizado como um marcador de CCR, no que se refere à determinação do prognóstico do paciente (JONSSON et al., 2018).

Dessa forma, a utilização de inibidores de MMP-9 trata-se de uma estratégia terapêutica particularmente interessante para reduzir a mortalidade proveniente do desenvolvimento de câncer colorretal metastático (LUBBE et al., 2006). Nesse sentido, a inibição de MMP-9 mediada por E-14 de *L. pacari*, merece destaque, devendo ser melhor investigada através da realização de estudos *in silico* e *in vivo*.

Dados da literatura corroboram com os resultados obtidos. Tem sido demonstrado que o ácido elágico foi capaz de inibir a atividade de MMP-9 em células de câncer de próstata (DU-145), câncer de mama (MCF-7 e Hs 578T) e de carcinoma de cólon (Caco-2) (LOSSO et al., 2004). Zhao e colaboradores (2013) demonstraram que o ácido elágico foi capaz de reverter a ocorrência da EMT, bem como de reduzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 em células PANC-1 (carcinoma hepático)

transplantadas em camundongos *nude*. Tanimura e colaboradores (2005) relataram que taninos hidrolisáveis são capazes de inibir a atividade das metaloproteínases 2 e 9, evidenciando que essa classe de compostos pode também ser responsável pelo efeito observado neste estudo.

A modulação de diversas vias está envolvida na regulação da EMT, portanto, na regulação dos processos de migração e invasão, podendo citar a ativação da via canônica da WNT, a inibição da via TGF- β /Smad e a ativação das vias das MAPK e PI3K/AKT. Tal modulação culmina na redução da expressão e dos níveis de E-caderina, proteína de membrana envolvida na manutenção da polaridade das células epiteliais e na estabilização do contato célula-célula, permitindo que as células permaneçam no estado epitelial e/ou na elevação da expressão e dos níveis de vimentina, proteína filamentosa que associa-se a filamentos de queratina KRT14, levando à formação de um híbrido que reduz a rigidez dos filamentos de queratina, favorecendo a migração celular (PRETZSCH et al., 2019).

Nesse sentido, foi relatado que o ácido elágico, bem como extratos da polpa das espécies *Fragaria annassa* e *Punica granatum* e das sementes de *Eugenia jambolana*, ricos em elagitaninos, foram capazes de inibir a sinalização da via WNT em células de adenocarcinoma de cólon (293T) (SHARMA et al., 2010). Diversos estudos demonstraram que o ácido elágico, bem como os elagitaninos são capazes de inibir a via das MAPK e a via PI3K/AKT (KOWSHIK et al., 2014; ESKANDARI et al., 2016; LIU et al., 2018; WANG et al., 2019; GUPTA et al., 2019), evidenciando o alto potencial anti-metastático da planta em estudo, bem como sugerindo proteínas e vias que também podem ser alvo de ação do extrato.

O papel do ON na carcinogênese vem sendo investigado. Estudos demonstraram que, quando presente em níveis elevados no microambiente tumoral, tal mediador contribui para o aumento da migração, invasão e progressão do tumor, sendo regulador chave na angiogênese através da regulação positiva do VEGF (LALA; CHAKRABORTY, 2001; PAPAPETROPOULOS; XU et al. 2002).

Neste estudo, a produção de ON por células HRT-18 tratadas com E-14 (16 μ g/mL) por 48 e 72 h foi avaliada através da reação de Griess. Tal reação avalia indiretamente a produção de óxido nítrico, visto que se baseia na quantificação de nitrito. Uma vez formado, o nitrito reage com o reagentes de Griess, constituído por sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilenodiamina, produzindo um corante azo, de coloração rosa, detectado em absorbância máxima de 540 nm. Para quantificar com precisão o

ON, uma curva de calibração é construída usando uma solução padrão de nitrito no meio da amostra (HUNTER et al., 2013).

Os dados obtidos através da execução deste ensaio, demonstraram que E-14 foi capaz de diminuir significativamente a produção do ON em células HRT-18, levando à produção e, conseqüentemente, a um fluxo intracelular de ON correspondente ao nível I, em que ocorre predominantemente a ativação da via GMPc, a qual exerce papel dúbio na carcinogênese, podendo exercer efeito pró ou anti tumoral (SOMASUNDARAM et al., 2019). Nesse sentido, é pertinente salientar que, em tumores colorretais a expressão endógena do ligante GMPc é perdida por um mecanismo ainda desconhecido, porém conservado em camundongos e seres humanos. Além disso, experimentos *in vivo*, mostraram que a reconstituição da sinalização de GMPc através da manipulação genética ou administração oral de ligantes desse receptor foi capaz de bloquear a tumorigênese em camundongos. Estes dados, quando avaliados em conjunto, sugerem que o câncer colorretal surge em um microambiente de inativação funcional do GMPc, que pode ser reparado pela administração do ligante oral (RAPPAPORT; WALDMAN, 2018). Portanto, infere-se que a restauração da sinalização mediada pelo GMPc induzida por E-14 pode estar relacionada ao potencial antitumoral do extrato. Possivelmente, o potencial citotóxico seletivo, bem como anti-metastático *in vitro* de E-14 pode estar relacionado à modulação da via do óxido nítrico.

Pereira e colaboradores (2018) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *L. pacari* foi capaz de diminuir a produção de ON por macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), corroborando com os resultados obtidos e sugerindo que a espécie vegetal avaliada pode exercer efeitos no microambiente tumoral. Park e colaboradores (2016) evidenciaram que os elagitaninos diméricos de *Cornus alba* foram também capazes de diminuir a produção de ON em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

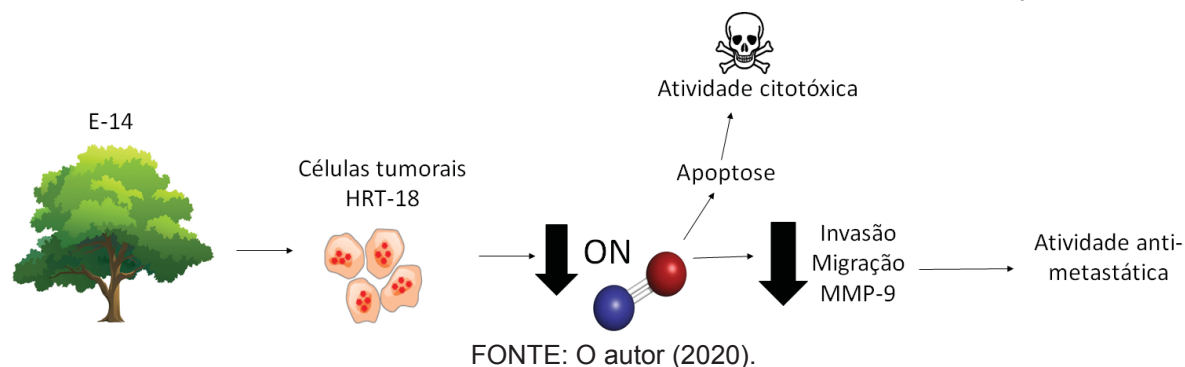
Com relação ao potencial envolvimento da via do ON na carcinogênese colorretal, Cianchi e colaboradores (2003) correlacionaram a expressão e a atividade do iNOS com o grau de angiogênese tumoral no CCR humano. Os autores detectaram níveis mais altos de iNOS no CCR em comparação aos tecidos adjacentes, indicando uma produção mais elevada de ON pelas células tumorais. Além disso, também identificaram uma forte correlação entre a expressão da iNOS e a angiogênese

tumoral, sugerindo a utilização de inibidores de iNOS como potenciais fármacos antineoplásicos.

Umesalma e Sudhandiran (2010) verificaram que o ácido elágico reduziu a expressão de iNOS, bem como de outras citocinas e mediadores inflamatórios (NF- κ B, COX-2, TNF- α e IL-6) em tumores de ratos submetidos ao modelo de carcinoma de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina. Dessa forma, ensaios para verificar a influência do extrato E-14 na transcrição e expressão de iNOS e NOS estão sendo realizados.

Considerando os dados apresentados na literatura, bem como os obtidos neste estudo, pode-se sugerir que a *L. pacari* é uma espécie vegetal promissora para a produção de um medicamento direcionado para o tratamento do câncer (Figura 15). O potencial antitumoral da planta deve ser melhor investigado em estudos *in vivo*, visto que apresenta importante efeito citotóxico/antiproliferativo seletivo sobre diversas linhagens celulares tumorais humanas, além de ser capaz de inibir a migração e a invasão celular em um mecanismo que provavelmente envolve a modulação da via do óxido nítrico.

FIGURA 15 – HIPÓTESE DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA, ANTIPROLIFERATIVA E ANTI-METASTÁTICA DO EXTRATO E-14 OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Dentre os 19 extratos de *L. pacari* testados, o mais promissor no que diz respeito à citotoxicidade e especificidade é o extrato E-14;
- O principal tipo de morte celular induzido por E-14 em células HRT-18 trata-se da apoptose;
- O extrato E-14 exerceu significativa atividade anti-metastática em células HRT-18, evidenciada pela redução da migração e invasão celular, bem como da inibição da atividade da MMP-9;
- O efeito citotóxico e anti-metastático de E-14 possivelmente se deve à modulação da via do óxido nítrico.

8 PERSPECTIVAS

Após o desenvolvimento deste trabalho, restam algumas propostas para estudos futuros mais aprofundados tais como:

- Avaliar o envolvimento da via intrínseca da apoptose no efeito citotóxico induzido por E-14, verificar os níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2, bem como determinar a capacidade do extrato E-14 em promover a despolarização mitocondrial;
- Caracterizar o envolvimento da via do óxido nítrico no efeito citotóxico e antiproliferativo de E-14 através da avaliação de citocinas, fatores de transcrição e vias de transdução de sinal comumente moduladas pelo óxido nítrico em células tumorais;
- Avaliar a atividade antitumoral, anti-metastática e antiangiogênica *in vivo* do extrato E-14.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, Z.; REHMAN, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. **Neoplasms**, p. 140-157, 2018.

ACS, American Cancer Society. **Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019**. Atlanta: American Cancer Society; 2017.

ACS, American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society; 2019.

AL-ABD, A. M. et al. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 591–605, 2017.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ÁRVORES DO BIOMA CERRADO. *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. 2019. Disponível em: <<http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/06/20/lafoensia-pacari-a-st-hil/>>. Acesso em 03/02/20.

ATHERINO, M. C. **Investigação da atividade citotóxica e antiproliferativa de extratos de *Lafoensia pacari* A. St-Hil. sobre células de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e captação de seus componentes por célula tumoral e não tumoral**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/62011?show=full>>

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993-2996, 2009.

BALKWILL, F; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **The Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.

BASKAR, R. et al. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 3, p. 193-199, 2012.

BERGHE, T. V. et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117-129, 2013.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, n. 6, p. 167-223, 2001.

BLAISE, G. A. et al. Nitric oxide, cell signaling and cell death. **Toxicology**, v. 208, n. 2, p. 177-192, 2005.

BORRA, R. C. et al. A Simple Method to Measure Cell Viability in Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, p. 255-62, 2009.

BURK, R. R. A Factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 2, p. 369-372, 1973.

BURKE, A. J. et al. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p. 503-512, 2013.

CALDERÓN-MONTAÑO J. M. et al. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, v. 2014, 9 p., 2014.

CARNEIRO, C. C. et al. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 310, p. 1-8, 2016.

CASEY, S. C. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, p. 199-223, 2015.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011.

CHEN, L. G. et al. Ellagitannins from *Terminalia calamansanai* induced apoptosis in HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 603–609, 2009.

CHEN, H. S. et al. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF- β /Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. **International Journal of Oncology**, v. 46, p. 1730-1738, 2015.

CHENG, H. et al. Ellagic acid inhibits the proliferation of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells *in vitro* and *in vivo*. **Oncotarget**, v. 8, p. 12301-12310, 2017.

CHO, H. et al. Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells. **Food & Function**, v. 6, p. 1675–1683, 2015.

CHUNG, Y. C. et al. The inhibitory effect of ellagic acid on cell growth of ovarian carcinoma cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 12 p., 2013.

CIANCHI, F. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 162, p. 793–801, 2003.

COLLINS, J. A. et al. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, p. 923–934, 1997.

CORDEIRO, Y. G. et al. Antineoplastic Effect of Procyanidin-rich Extract of *Lafoensia pacari* in Lung Carcinoma Cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 13 p., 2019.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584, 2015.

CZEKANSKA, E.M.. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 27–32, 2011.

DATI, L. M. M. **Caracterização das vias de morte celular induzida pela metilecgonidina, produto da pirólise da cocaína**. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental), - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-14012013-101114/pt-br.php>>. Acesso em: 12/01/2019.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n.1, p. 118-129, 2005.

DE MELO, et al. Medicinal plants used as antitumor agentes in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 14 p., 2011.

DE MOLINA, A. R. et al. The ellagic acid derivative 4,4'-Di-O-methylellagic acid efficiently inhibits colon cancer cell growth through a mechanism involving WNT16. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 353, p. 433-44, 2015.

DIKMEN, M. et al. The Antioxidant Potency of *Punica granatum* L. Fruit Peel Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis on Breast Cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 638–1646, 2011.

DUAN, J. et al. The red wine component ellagic acid induces autophagy and exhibits anti-lung cancer activity in vitro and in vivo. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, p. 143–154, 2019.

DUFFY, M. J. The Biochemistry of Metastasis. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 32, p. 135-166, 1996.

ECCLES, S.; WELCH, D. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **Lancet**, v. 369, p. 1742–1757, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESKANDARI, E. et al. Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.12, p. 1266-1271, 2016.

ESPÍN, J. C. et al. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 15 p., 2013.

FAVAROLO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330-349, 2012.

FELIPE, K. B. **Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris***. 127 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/94078/280965.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 12/01/2019.

FERNANDES, M. R. et al. Morfobiometria carpo seminal e germinação de *Lafoensia pacari* A. St. Hil.(Lythraceae) exposta a diferentes concentrações de GA3. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 2571-2584, 2012.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005.

FIRMO, W. C. A.; MIRANDA, M. V.; OLEA, R. S. G. Caracterização do “estado da arte” de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.(Lythraceae). **Natureza on line**, v. 14, n. 1, p. 012-022, 2016.

FLOOR, S. L. et al. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 9, p. 509-2015, 2012.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FURQAN, M. et al. STAT inhibitors for cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 1, p. 90, 2013.

GALDIERO, M. R.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Cancer inflammation and cytokines. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v.10, n. 8, p. 1-18, 2018.

GALLO, O. et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 8, p. 587-596, 1998.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GARBÁN, H. J.; BONAVIDA, B. Nitric oxide sensitizes ovarian tumor cells to Fas-induced apoptosis. **Gynecologic Oncology**, v. 73, n. 2, p. 257-264, 1999.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1796, n. 2, p. 293–308, 2009.

GIOVANONNI, G. et al. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 34, p.193-198, 1997.

GLYNN, S. A. et al. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor–negative breast cancer patients. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3843-3854, 2010.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-695, 2006.

GUPTA, A. et al. Corilagin in cancer: a critical evaluation of anticancer activities and molecular mechanisms. **Molecules**, v. 24,19 p., 2019.

GUZMÁN, C. et al. ColonyArea: an imageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. **PLoS One**, v. 9, p. 1-9, 2014.

HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 23 p., 2014.

Hall D.M.S., Brooks S.A. *In Vitro* Invasion Assay Using Matrigel™: A Reconstituted Basement Membrane Preparation. In: Dwek M., Schumacher U., Brooks S. (eds) **Metastasis Research Protocols**. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), v. 1070. Humana Press, New York, NY, 2014.

HAWKES, S. P.; LI, H.; TANIGUCHI, G. T. Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs, and TIMPs. **Methods in Molecular Biology**, v. 151, p. 399-410, 2001.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714-726, 2013.

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P. S.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 10, suppl 1, 10 p., 2008.

HUNTER, R. A. et al. Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 1957–1963, 2013.

HUSSAIN, S. P. et al. Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p. 7130-7136, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Ministério da Saúde. O que é o câncer**. 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 12/01/2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Ministério da Saúde. Tratamento do câncer**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/cirurgia>>. Acesso em: 29/01/2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Ministério da Saúde. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2019 a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. 2019 b.

JAN, R.; CHAUDHRY, G. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205, 2019.

JENDIROBA, D. B. et al. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dymethylsphingosine. **Leukemia Research**, v. 26, n. 3, p.301-310, 2002.

JONSSON, A. et al. Stability of matrix metalloproteinase-9 as biological marker in colorectal cancer. **Medical Oncology**, v. 35, 6 p., 2018.

KASIBHATLA, S.; TSENG, B. Why target apoptosis in cancer treatment? **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 2, n. 6, p. 573-580, 2003.

KASIMSETTY, S. G. et al. Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2180–2187, 2010.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 27-45, 2002.

KOWSHIK, J. et al. Ellagic acid inhibits VEGF/VEGFR2, PI3K/Akt and MAPK signaling cascades in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1249-60, 2014.

KUIPERS, E. J. et al. Colorectal Cancer. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 1, 51 p., 2015.

LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **The lancet oncology**, v. 2, n. 3, p. 149-156, 2001.

LARROSA, M. et al. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 611-625, 2006

LEBER, M. F.; EFFERTH, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). **International Journal of Oncology**, v. 34, p. 881-895, 2009.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.

LI, J. et al. Punicalagin and ellagic acid from pomegranate peel induce apoptosis and inhibits proliferation in human HepG2 hepatoma cells through targeting mitochondria. **Food And Agricultural Immunology**, v. 30, p. 897–912, 2019.

LI, L. W. et al. Ellagic acid induces HeLa cell apoptosis via regulating signal transducer and activator of transcription 3 signaling. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, p. 29-36, 2018.

LIPÍŃSKA, L.; KLEWICKA, E.; SÓJKA, M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 289-299, 2014.

LISBOA, R. A.; ANDRADE, M. V.; CUNHA-MELO, J. R. Zimography is an effective method for detection of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity in cultured human fibroblasts. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, p. 216-220, 2013.

LIU, M. J. et al. Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 194, p. 141– 155, 2004.

LIU, Q. et al. Ellagic acid promotes A549 cell apoptosis via regulating the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, p. 347-352, 2018.

LOSSO, J. N. et al. *In vitro* anti-proliferative activities of ellagic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 672–678, 2004.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 221-233, 2006.

LUBBE, W. J. et al. Tumor epithelial cell matrix metalloproteinase 9 is a target for antimetastatic therapy in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 1877-1882, 2006.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 10, n. 1, p. 81-93, 2000.

MAHAVORASIRIKUL, W. et al. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 1472-6882, 2010.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 36-37, 2009.

MARCONDES, D. B. S. et al. Citotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 243-250, 2014.

MARSHALL, J. Transwell® Invasion Assays. In: Wells C., Parsons M. (eds) Cell Migration. **Methods in Molecular Biology**, v. 769, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21748672>>. Acesso em: 30/12/2019.

MENG, H. et al. NEDD9 promotes invasion and migration of colorectal cancer cell line HCT116 via JNK/EMT. **Oncology Letters**, v. 18, p. 4022-4029, 2019.

MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from Muscadine Grapes (*Vitis rotundifolia*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5336-5343, 2006.

MILLER, A. B. et al. Reporting Results of Cancer Treatment. **Cancer**, v. 47, n. 1, p. 207-214, 1981.

MUNDO, S. R.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.(Lythraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 522, 2007.

MUNN, L. L. Cancer and inflammation. **Wiley Periodicals Inc**, v. 9, 13 p., 2017.

MUNSHI, A.; HOBBS, R.; MEYN, R. Clonogenic cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21-28, 2005.

MUKHERJEE, A. K. et al. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.

MUSUMECI, F. et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors: Drugs and New Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10797-10822, 2012.

NAM, N. H. Naturally occurring NF- κ B inhibitors. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 8, p. 945-951, 2006.

NARAYANAN, B. A. et al. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **Cancer Letters**, v. 136, p. 215-221, 1999.

NOCIARI, M. M. et al. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 213, p. 157-67, 1998.

NOWAK, A. et al. Ellagitannins from *Rubus idaeus* L. exert geno- and cytotoxic effects against human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 2947-2955, 2017.

OLIVEIRA, M. C. et al. Manual de viveiro e produção de mudas: espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Embrapa Cerrados-Outras publicações científicas (ALICE)**, 2016.

PAJARI, A. M. et al. Ellagitannin-rich cloudberry inhibits hepatocyte growth factor-induced cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT activation in colon carcinoma cells and tumors in Min mice. **Oncotarget**, v. 7, p. 43907-43923, 2016.

PAPAPETROPOULOS, A. et al. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 12, p. 3131-3139, 1997.

PARREIRAS, F. C. et al. Aspectos genéticos do câncer colorretal e seu impacto no manejo da doença. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 23, p. 221-227, 2013.

PARREIRAS, F. C. et al. Cancer Immunediting and Hijacking of the Immune System. In: FIOR, R.; ZILHÃO, R. **Molecular and Cell Biology of Cancer - When Cells Break the Rules**. Springer Switzerland AG, p. 117-139, 2019.

PARK, K. H. et al. Antiproliferative effects of new dimeric ellagitannin from *Cornus alba* in prostate cancer cells including apoptosis-related s-phase arrest. **Molecules**, v. 21, 11 p., 2016.

PASA, M, C.; CABRAL, P. R. F. Mangava-brava: *Lafoensia pacari* St.-Hil. (Lythraceae) e a Etnobotânica em Cuiabá, MT. **Biodiversidade**, v. 8, n. 1, 2009.

PEREIRA, L. O. M. et al. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 337-350, 2018.

PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603-619, 2016.

PITCHAKARN, P. et al. Ellagic acid inhibits migration and invasion by prostate cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 2859-2863, 2013.

PLUMB, J. A. Cell sensitivity assays: clonogenic assay, in: S.P. Langdon (Ed.), **Cancer Cell Cult: Methods Protoc**. Methods in Molecular Medicine, Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 159-164, 2004.

PRETZSCH, E. et al. Mechanisms of metastasis in colorectal cancer and metastatic organotropism: hematogenous versus peritoneal spread. **Journal of Oncology**, v. 2019,13 p., 2019.

QU, X.; TANG, Y.; HUA, S. Immunological approaches towards cancer and inflammation: a cross talk. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 563, 2018.

RAPPAPORT, J. A.; WALDMAN, S. A. The guanylate cyclase c—cGMP signaling axis opposes intestinal epithelial injury and neoplasia. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 17 p., 2018.

REICHERT, C. L. et al. Metabolic profiling and correlation analysis for the determination of killer compounds of proliferating and clonogenic HRT-18 colon cancer cells from *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 541–552, 2018.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1458-1461, 2006.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S. et al. **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 12/01/2019.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J. L. Wound-Healing assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 294, p. 23-29.

ROSSI, J. F. et al. Interleukin-6 as a therapeutic target. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 6, p. 1248-1257, 2015.

SALIMIAN, R. B.; ACHREJA, A.; NAGRATH, D. Nitric oxide: the forgotten child of tumor metabolism. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 9, p. 659–672, 2017.

SAMPAIO, B. L. et al. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1127-1137, 2011.

SANTOS, L. W. dos. **Estudos ecológicos e agronômicos de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) na região de Barra do Garças—MT. 2006**. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

SANTOS, L. W.; COELHO, M. F. B.; PIRANI, F. R. Fenologia de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 1, p. 12-17, 2009.

SANTOS, A. F. **Estudo do efeito antitumoral da fração de alcaloides totais isolada de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., Apocynaceae e desenvolvimento e validação de software de mensuração de área e contagem de número de colônias**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2018.

SANUPHAN, A. et al. Long-term nitric oxide exposure enhances lung cancer cell migration. **BioMed Research International**, v. 2013, 9 p., 2013.

SCHEER, M. B. et al. Crescimento e nutrição de mudas de *Lafoensia pacari* com lodo de esgoto. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 1, p. 55-65, 2012.

SCHILLING, R.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Characterization of the Ripoptosome and Its Components: Implications for Anti-inflammatory and Cancer Therapy. **Methods in Enzymology**, v. 545, p. 83–102, 2014.

SCHMID, I. et al. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 204-208, 2012.

SCHULTZ, D. R.; HARRINGTON, J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 32, p. 345-369, 2003.

SHABANA. S. M. et al. Ellagic acid enhanced apoptotic signaling pathway and inhibit cell cycle progression through modulation of redox balance in Ehrlich ascites carcinoma cells in mice. **Journal of Advanced Trends in Basic and Applied Science**, v. 2, p. 23-32, 2018.

SHARMA, M. et al. Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3965–3969, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019.

SIEGERT, A. et al. Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 8, p. 1310-1315, 2002.

SOMASUNDARAM, V. et al. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction and Metabolism. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, n. 8, p. 1124-1143, 2019.

STINTZING, S. Management of colorectal cancer. **F1000Prime Reports**, v. 6, p. 108-120, 2014.

SUMANTRAN, V. N. Chemosensitivity assays: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 219–236, 2011.

TANG, D. et al. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, v. 29, p. 347–364, 2019.

TANIMURA, S. et al. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p.1306–1313, 2005.

TODA, K. et al. Ellagitannins from *Punica granatum* leaves suppress microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and induce lung cancer cells to undergo apoptosis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, p. 1347-6947, 2019.

TODORIC, J.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 12, p. 895–906, 2016.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF α , and IL-6 in 1,2-Dimethylhydrazine-Induced rat colon carcinogenesis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 650–655, 2010.

UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, p. 249-258, 2011.

UMESALMA, S.; NAGENDRAPRABHU, P.; SUDHANDIRAN, G. Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 399, p. 303–313, 2014.

VAKKALA, M. et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis *in situ* and invasive breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 2408-2416, 2000.

VALADÃO, M.; CASTRO, L. S. Câncer colo-retal hereditário. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, n. 3, p. 193-200, 2007.

VANELLA, L. et al. Ellagic acid: cytodifferentiating and antiproliferative effects in human prostatic cancer cell lines. **Current pharmaceutical design**, v. 19, p. 2728-2736, 2013.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VICINANZA, R. et al. Pomegranate juice metabolites ellagic acid and urolithin A, synergistically inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth via distinct effects on cell cycle control and apoptosis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 12 p., 2013.

VINAY, K. et al. **Robbins patologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

VOURI, M.; HAFIZI, S. TAM receptor tyrosine kinases in cancer drug resistance. **Cancer Research**, v. 77, n. 11, p. 2775-2778, 2017.

WANG, D. et al. Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, p.143 – 149, 2016.

WANG, Y. et al. Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. **Journal of Cancer**, v. 10, p. 3303-3314, 2019.

WEISBURG, J. H. et al. Ellagic Acid, a dietary polyphenol, selectively cytotoxic to HSC-2 oral carcinoma cells. **Anticancer Research**, v. 33, p. 1829-1836, 2013.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 369-36, 2005.

WINK, D. A. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 711-721, 1998.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. In: **Methods in cell biology**. Academic Press, p. 55-98, 2011.

WU, Y. et al. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 164–173, 2014.

XIE, K.; FIDLER, I. J. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, n. 1, p. 55-75, 1998.

XU, W. et al. The role of nitric oxide in cancer.. v. 12, n. 5-6, p. 311-320, 2002.

XU, J. et al. TGF- β - induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 156-172, 2009.

XU, W. et al. Ellagic acid and Sennoside B inhibit osteosarcoma cell migration, invasion and growth by repressing the expression of c-Jun. **Oncology Letters**, v. 16, p. 898-904, 2018.

XU, X.; LAI, Y.; HUA, Z. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience reports**, v. 39, n. 1, 17 p., 2019.

YU, T.; TANG, B.; SUN, X. Development of inhibitors targeting hypoxia-inducible factor 1 and 2 for cancer therapy. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 3, p. 489-496, 2017.

ZHAO, M. et al. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. **Cancer Letters**, v. 337, p. 210–217, 2013.

ZHAO, J. et al. Multiple effects of ellagic acid on human colorectal carcinoma cells identified by gene expression profile analysis. **International Journal of Oncology**, v. 50, p. 613-621, 2017.